MESSUNG VON EXHALATION UND ABBAU FLÜCHTIGER KOHLENWASSERSTOFFE ZUM NACHWEIS VON LEBERSCHÄDEN BEI RATTEN UND MÄUSEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ABD EL MAJID GHARAIBEH
aus Irbid (Jordanien)

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0053

MESSUNG VON EXHALATION UND ABBAU FLÜCHTIGER KOHLENWASSERSTOFFE ZUM NACHWEIS VON LEBERSCHÄDEN BEI RATTEN UND MÄUSEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Abd el Majid Gharaibeh
aus Irbid (Jordanien)

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	9. Juli 1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Mecke
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Remmer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1980 bis Dezember 1985 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Herbert Remmer durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. H. Remmer.
Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. U. Breyer-Pfaff, die in vielen Diskussionen und mit Rat und Tat wesentlich dazu beigetragen hat, die Arbeit in die vorliegende Form zu bringen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. M. Siess für seine Unterstützung.
Weiterhin danke ich Herrn R. Werle, der die Arbeit getippt und druckfertig eingerichtet hat.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

I.1 HEPATOTOXISCHE SCHÄDIGUNG 1

I.1.1 Direkte und indirekte Leberschädigung 1

I.1.2 Lipidperoxidation 4

I.1.3 Die kovalente Bindung 6

I.1.4 Weitere Messungen zur Beurteilung der Hepatotoxizität 8

I.1.5 Lebertoxizität von Ethanol 9

I.1.5.1 Ethanolstoffwechsel 9

I.1.5.2 Wechselwirkung zwischen Alkoholen und anderen Hepatotoxinen 10

I.2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT 15

II. MATERIAL UND METHODEN 17

II.1 MATERIAL 17

II.2 METHODEN 18

II.2.1 In-vivo-Experimente 18

II.2.2 In-vitro-Experimente 30

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 35

III.1 HEMMENDE UND FÖRDERNDE EFFEKTE AUF DIE HEPATOTOXIZITÄT VON CCl_4 UND PARACETAMOL 35

III.1.1 Bestimmung der LD_{50} von CCl_4 bei weiblichen SIV-Ratten im Exsikkatorsystem 35

III.1.2 Der Einfluß von Diethylmaleat-Vorbehandlung auf die Lipidperoxidation unter CCl_4 36

III.1.3 Der Einfluß von Nahrungsentzug und Induktion der Cytochrom-P-450-Monooxygenase auf die hepatotoxische Wirkung von Paracetamol und CCl_4 37

III.1.4 Einfluß von L-Methionin, L-Cystein und Acetylsalicylsäure 52
III.1.5 Einfluß von Paracetamol auf die Kohlenwasserstoffbildung in vitro 57
III.2 DER EINFLUSS VON PARACETAMOL, TETRACHLORMETHAN UND BROMBENZOL AUF DIE METABOLISIERUNG VON PENTAN UND ISOBUTEN 57
III.3 DER EINFLUSS VON AKUTEM ETHANOL 58
III.3.1 Abatmung von Isobuten nach der Intoxikation mit Ethanol 58
III.3.2 Ethanol und CCl_4 66
III.3.3 Ethanol und Paracetamol 68
III.3.4 Ethanol und Eisen 71
III.3.5 Ethanol und Dimethylsulfoxid 77
III.4 DER EINFLUSS VON CHRONISCHEM ETHANOL AUF DIE LIPIDPEROXIDATION BEI VERSCHIEDENEN DIÄTEN 77
III.5 ENTSTEHUNG VON KOHLENWASSERSTOFFEN DURCH DIE METABOLISIERUNG VON FREMDSTOFFEN 79
III.6 DER EINFLUSS VON ETHIONIN AUF DIE KOHLENWASSERSTOFFABATMUNG 87
III.7 DER EINFLUSS VON BROMBENZOL AUF DIE KOHLENWASSERSTOFFABATMUNG 90
III.8 KOHLENWASSERSTOFFABATMUNG NACH DER INTOXIKATION MIT 2-FURAMID ODER THIOPHEN 93
III.8.1 2-Furamid 93
III.8.2 Thiophen 97

IV. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION 105

V. ZUSAMMENFASSUNG 111

VI. TABELLENANHANG 114

VII. LITERATURVERZEICHNIS 118

Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphorsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion (reduziert)
i.p.	intraperitoneal
KW	Kohlenwasserstoffe
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPO	Lipidperoxidation
MC	3-Methylcholanthren
MDA	Malondialdehyd
NAD	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Pb	Phenobarbital
p.o.	per os
SGOT	Serum Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SKF 525A	β-Diethylaminoethyldiphenylpropylacetat

I. EINLEITUNG

I.1 HEPATOTOXISCHE SCHÄDIGUNGEN

Eine große Zahl chemischer und biologischer Stoffe wirken schädigend auf die Leber. Diese Hepatotoxine stammen zum Beispiel aus Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Mineralien. Auch synthetische Stoffe aus der pharmazeutischen und chemischen Industrie gehören dazu. Die bisherige Forschung zur Wirkungsweise und zum Abbau verschiedener Hepatotoxine ist sich einig, daß der Abbau der in dieser Arbeit untersuchten Hepatotoxine dem folgenden Schema gehorcht: Die inkorporierte Substanz, die selbst noch nicht toxisch wirkt, wird mit Hilfe bestimmter Isoenzyme der Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenase metabolisiert. Die entstehenden Produkte wiederum werden durch Substanzen wie Glutathion zu hydrophilen, ausscheidbaren Abbauprodukten umgesetzt. Das heißt, daß der Abbauprozeß drei Glieder umfaßt, dergestalt daß die inkorporierte Substanz selbst nicht toxisch wirkt, das ausscheidbare Endprodukt ebenfalls keine Toxizität besitzt, jedoch die intermediär entstehenden Metaboliten toxisch sein können. Entsprechend der toxischen Wirkung der Metaboliten lassen sich zwei Gruppen von Hepatotoxinen unterscheiden.

I.1.1 DIREKTE UND INDIREKTE LEBERSCHÄDIGUNG

Die Metaboliten einer Gruppe von Substanzen verursachen eine direkte Schädigung an den Plasmamembranen, dem endoplasmatischen Retikulum und anderen Zellbestandteilen. Ein Prototyp dieser Substanzen ist CCl_4. Dieses führt zur Peroxidation der Lipide, zur Denaturierung der Proteine sowie anderen physiochemischen Veränderungen, die unmittelbar nach der Applikation auftreten. Andere Substanzen, die ähnliche Zellschädigungen zeigen, sind $CBrCl_3$, Tribrommethan, Chloroform, Jodoform und elementarer Phosphor.

Eine indirekte Schädigung wird entweder durch Eingreifen in metabolische Prozesse oder in Prozesse, die für die Integrität der Hepatozyten essentiell sind, hervorgerufen.

Als Beispiel hierfür kann die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Ethionin und die den Stoffwechsel störende Schädigung durch Galaktosamin angeführt werden.

Eine indirekte Schädigung kann auch durch den Entzug von bestimmten Stoffen, die für die Entgiftung mancher Toxine wie Brombenzol und Paracetamol wichtig sind, verursacht werden; dazu zählen Glutathion, schwefelhaltige Aminosäuren, Vitamin E und Selen (Schiff 1975). Auch Hunger, Proteinmangel, fett- oder kohlenhydratreiche Diät können für die Toxizität eine entscheidende Rolle spielen. Eine eindeutige Trennung von direkter und indirekter Leberschädigung ist kaum möglich, da mit Erhöhung der Dosis von Hepatotoxinen andere Wirkungen in den Vordergrund treten können.

Auch Stoffe, die eine Cholestase hervorrufen, gehören zu den indirekt wirkenden Hepatotoxinen. Benannt seien Icterogenin, C-17-alkylierte Steroide, Rifamycin und Chlorpromazin. Darüber hinaus wirken viele indirekte, aber auch direkte Hepatotoxine karzinogen.

Bei den direkten Hepatotoxinen (insbesondere CCl_4) ist bekannt, daß die Toxizität der Metaboliten auf der Entstehung von Radikalen beruht, die in verschiedenen Zellbestandteilen ungesättigte Fettsäurenangreifen und Membranen zerstören. Dieser Prozeß ist eine grundsätzliche Begleiterscheinung des Abbaus direkter Hepatotoxine, weshalb selbst kleinste Substanzmengen toxisch wirken. Wenn bei entsprechend kleinen Dosen dieser Substanzen dennoch keine dauerhafte Schädigung des Organismus stattfindet, so deshalb, weil die toxische Schädigung durch langfristige Prozesse wie Zellregeneration aufgefangen werden kann. Dies ändert jedoch nichts an der Tatsache, daß diese Substanzen schon in kleinsten Mengen toxisch sind.

Anders liegt der Fall bei verschiedenen indirekten Hepatotoxinen (insbesondere den Aromaten Paracetamol, Brombenzol, Thiophen und 2-Furamid). Die Zwischenprodukte des Abbauprozesses dieser Hepatotoxine zeigen bis zu einer bestimmten Menge keine toxische Wirkung. Das heißt, wenn bei entsprechend kleinen Dosen dieser Substanzen keine Schädigung des Organismus stattfindet, so deshalb, weil die Leberzellen über ein Abbausystem für diese Substanzen verfügen, welches die Zwischenprodukte schnell entgiftet. Erst eine Dosis, die das körpereigene Abbausystem überfordert, führt zur Akkumulation von Zwischenprodukten, die eine toxische Wirkung entfalten.

Während die Ausbildung von Radikalen bei den direkten Hepatotoxinen der

entscheidende toxische Prozeß ist, ist bei den genannten Aromaten bislang umstritten, worin die zentrale toxische Wirkung besteht: Es läßt sich vermuten, daß eine Überdosis dieser Aromaten analog zu den direkten Hepatotoxinen zur Ausbildung von Radikalen führt. Rosen et al. (1983) konnte in vitro zeigen, daß Paracetamol in Lebermikrosomen Radikale ausbildet. In-vivo-Experimente mit Ratten und Mäusen zeigten, daß ein Großteil der Metaboliten dieser Substanzen über kovalente Bindungen an Leberproteine gebunden sind.

Wichtig für die Untersuchung des Abbauprozesses dieser Aromaten ist es, daß zum Abbau in vivo zwei Komponenten beitragen: Einerseits das Cytochromsystem P-448 und/oder P-450, dessen Menge über die Geschwindigkeit der ersten Abbaustufe entscheidet, andererseits die Menge an Glutathion, die über die Entgiftungsgeschwindigkeit der toxischen Zwischenprodukte entscheidet. Da die genannten Aromaten in kleinen Mengen nicht toxisch wirken, muß in diesem Fall angenommen werden, daß sowohl ausreichend Cytochrom als auch Glutathion vorhanden ist, um einen Abbau ohne Zellschädigung zu bewerkstelligen. Gestört wird dieser natürliche Abbauprozeß durch drei Faktoren:

1. Durch eine Überdosis des indirekten Hepatotoxins, wodurch langfristig (ca. 48 Stunden) das Abbausystem überfordert ist und schließlich zusammenbricht. Hierbei scheint die Ausbildung kovalenter Bindungen der zentrale Mechanismus zu sein.
2. Durch eine induzierte Überfunktion des Cytochromsystems werden mehr Zwischenprodukte gebildet, ohne daß deswegen kurzfristig mehr Glutathion zur Verfügung stünde. Ein vollständiger Abbau der Zwischenprodukte verzögert sich deshalb, und es treten Radikale als toxisches Produkt auf.
3. Analog zu 2. steht zu erwarten, daß eine künstliche Absenkung des Glutathionspiegels (was insbesondere durch Futterentzug zu erzielen ist) ebenfalls zur Ausbildung von Radikalen führt, wie dies bei einer Überfunktion des Cytochromsystems der Fall ist.

Weiterhin ist zu erwarten, daß ein Zusammentreffen von induzierter Überfunktion des Cytochromsystems und Senkung des Glutathionspiegels zu einer Potenzierung der Toxizität führt.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwiefern die Abbauprozesse indirekter Hepatotoxine bei Erhöhung der Dosis bzw. unter bestimmten Bedingungen mit denen direkter Hepatotoxine vergleichbar sind. Dazu wurden Experimente zur Toxizität von CCl_4 einerseits und verschiedenen Aromaten und Ethanol andererseits durchgeführt.

I.1.2 LIPIDPEROXIDATION

Man bezeichnet den autokatalytischen Zerfall von Lipiden unter Beteiligung von Sauerstoff als Lipidperoxidation. Durch diese autokatalytische Oxidation von Fettsäuren entstehen verschiedene Zerfallsprodukte wie Ketone, Aldehyde, Säuren; auch Kohlenwasserstoffe, vor allem Ethan und Pentan (Horvat et al. 1964), können sich aus diesen Fettsäuren bilden. Die n-Pentan-Entstehung aus Linolensäure wurde von Donovan und Menzel (1978) bestätigt. Dabei wurde angenommen, daß Fettsäurehydroperoxide durch die katalytische Wirkung von Eisenkomplexen zu Kohlenwasserstoffen zerlegt werden. Die Bestimmung von Kohlenwasserstoffen in vitro korreliert gut mit anderen Verfahren zur Messung der Lipidperoxidation wie von Malondialdehyd, Dienkonjugation, Hydroperoxiden und Fluoreszenz (Smith et al. 1982); sie ist das einzige Verfahren, welches für in vivo Untersuchungen geeignet ist. Außerdem bietet es den Vorteil, daß es nicht-invasiv anwendbar ist. Ethanexhalation als Zeichen einer Lipidperoxidation wurde erstmals von Riely et al. (1974) beschrieben. Sie behandelten Mäuse mit CCl_4 und bestimmten das Ethan der Atemluft. Außer Ethan ließ sich auch Pentan in Versuchen mit Ratten nachweisen, die eine Vitamin-E-arme Diät erhielten (Dillard et al. 1977). Später wurde diese Methode von Frank et al. (1980a,b) verbessert, sodaß auch andere Kohlenwasserstoffe (wie Ethylen, Propan, n-Butan und i-Buten) bestimmt werden können.

Viele Toxine verursachen den Zerfall der Lipide der Zellmembran, wobei Ethan und Pentan entstehen. Die meisten dieser Gifte sind Hepatotoxine wie CCl_4. In einigen Fällen wurde bei der Untersuchung ihrer Wirkung entweder Ethan oder Pentan bestimmt; andere Kohlenwasserstoffe wie Ethylen, Propan, Butan und i-Buten wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Bildung von Ethan und Pentan wird auf den peroxidativen Zerfall von (ω-3)- bzw. (ω-6)-ungesättigten Fettsäuren zurückgeführt (Dumelin und Tappel 1977, vgl. S. 79 dieser Arbeit).

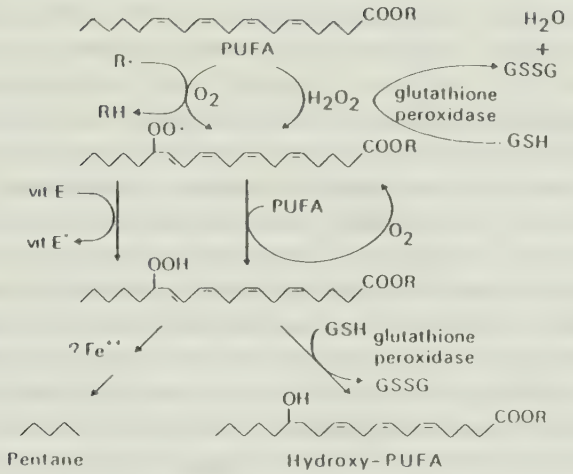

Abb. 1: Bildung von Pentan aus (ω-6)-ungesättigten Fettsäuren, Ethan stammt analog aus (ω-3)-ungesättigten Fettsäuren, (Nach Mitchell 1982)

Als weitere Beweise für die Beteiligung der Lipidperoxidation an der Toxizität von CCl_4 gelten die Abnahme von Arachidonsäure und die Erhöhung der Dienkonjugation in den mikrosomalen Lipiden. Glende et al. (1976) machten die Lipidperoxidation für die Zerstörung von Glucose-6-phosphatase und Cytochrom P-450 verantwortlich. Weiteres Indiz für die Lipidperoxidation ist die Entstehung von Malondialdehyd (Ghoshal und Recknagel 1965). Recknagel et al. (1977) sahen die Lipidperoxidation als Ursache der hepatotoxischen Wirkung von CCl_4. Sie gingen davon aus, daß CCl_4 zu CCl_3-Radikalen metabolisiert werden kann. Diese Radikale greifen die poly-ungesättigten Fettsäuren der mikrosomalen Phospholipide an und abstrahieren Wasserstoff aus diesen Fettsäuren; dadurch wird eine Lipidperoxidation ausgelöst, die das endoplasmatische Retikulum schädigt.

Dabei ist die These, daß die Lipidperoxidation durch CCl_3-Radikale initiiert werden kann, nicht ohne Kritik geblieben. Mäuse konnten CCl_4 metabolisieren ohne nachweisbare Lipidperoxidation (de Toranzo et al. 1978). Auch in den Hepatozyten konnte eine CCl_4-abhängige Schädigung ohne Betei-

ligung der Lipidperoxidation festgestellt werden (Stacy and Priestly 1978). Schließlich schädigte CCl_4 das Cytochrom P-450 unter anaeroben Bedingungen, also ohne Beteiligung einer Lipidperoxidation (De Groot und Haas 1980).

Andere Hepatotoxine wie Paracetamol und Brombenzol können auch eine Lipidperoxidation auslösen. Mäuse, die vorher nüchtern gesetzt wurden (48h Futterentzug) und Paracetamol erhielten, exhalierten große Mengen Ethan (Wendel et al. 1979). Die abgeatmete Menge an Ethan korrelierte mit den entstandenen Mengen an Malondialdehyd in den Lebern dieser Tiere.

Paracetamol löste auch eine Lipidperoxidation in isolierten Ratten- und Mäuse-Hepatozyten aus. Eine Vorbehandlung der Tiere mit 3-Methylcholanthren (ein Induktor von Cytochrom P-448) verstärkte die Lipidperoxidation, die durch Paracetamol verursacht wurde. Eine Vorbehandlung mit Phenobarbital (ein Induktor von Cytochrom P-450) hatte keinen Einfluß auf die Lipidperoxidation (Albano et al. 1983). Dagegen hemmte Vitamin E die durch Paracetamol ausgelöste Lipidperoxidation (in vitro) (Fairhurst et al. 1982). In vitro ließen sich auch Paracetamol-Radikale nachweisen (Rosen et al. 1983).

15 bis 20 Stunden nach der Behandlung von Mäusen mit Brombenzol wurden beträchtliche Mengen an Malondialdehyd in den Lebern dieser Mäuse gefunden; die SGPT stieg auf das 40-fache an (Casini et al. 1986). Die Lebernekrose (gemessen an SGPT) korrelierte mit der Lipidperoxidation, aber nicht mit der kovalenten Bindung von Brombenzol-Metaboliten an den Proteinen. Eine Gabe von 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox C) konnte die Lipidperoxidation hemmen und die Lebernekrose verhindern. Die kovalente Bindung blieb unverändert (Casini et al. 1985).

I.1.3 DIE KOVALENTE BINDUNG

Die kovalente Bindung von Metaboliten mancher Hepatotoxine an biologisches Material der Leberzellen wird von vielen Autoren als Ursache der hepatotoxischen Wirkung dieser Substanzen angenommen. Zwei Stunden nach $^{14}CCl_4$-Gabe (in vivo) fand Reynolds (1967), daß 40 Prozent der nichtflüchtigen Radioaktivität an den Lipiden, 15 Prozent an den Proteinen gebunden war; den Rest (10 Prozent) fand er in den säurelöslichen Zellbestandteilen. Die kovalente Bindung von $^{14}CCl_4$-Metaboliten in vivo wurde später von Diaz

Gomez et al. (1973) und Uehleke und Werner (1975) bestätigt. Link et al. (1984) fanden auch unter anaeroben Bedingungen, daß 30 bis 50 Prozent der CCl_4-Metaboliten an den mikrosomalen Lipiden kovalent gebunden waren.

Nur die Hälfte des Phosphatidylcholins, das durch kovalente Bindungen von CCl_4-Metaboliten modifiziert war, ließ sich durch Phospholipase A_2 spalten (Frank und Link 1984). Diese Autoren vermuteten, daß Vernetzungsprodukte zwischen den Fettsäuren der Membranlipide als Folge der CCl_3-Addition entstehen konnen, wobei die Lipide wahrscheinlich resistent gegenüber enzymatischer Spaltung werden.

Jollow et al. (1973) betrachteten die kovalenten Bindungen von Paracetamol-Metaboliten an den Proteinen der Leber als Ursache der hepatotoxischen Wirkung von Paracetamol. Zwei Stunden nach Gabe von ^{3}H-Paracetamol in vivo bei gefütterten Mäusen fanden diese Autoren einen Großteil des radioaktiven Materials an den Proteinen der Leber gebunden (2 nmol/mg Protein). Betroffen waren hauptsächlich Proteine der Mikrosomen und des Cytosols. Die Bindung an Proteine und die Lebernekrose waren dosisabhängig. Die kovalenten Bindungen und die Lebernekrose ließen sich steigern durch Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren bzw. hemmen durch Piperonylbutoxid oder Kobaltchlorid.

McMurtry und Mitchell (1977) konnten nach Gabe von Thiophen und 2-Furamid an Ratten oder Mäuse Leber- und Nierennekrose beobachten, die nach Vorbehandlung mit Piperonylbutoxid oder Kobaltchlorid vermindert waren. Wurden die Mäuse mit Phenobarbital vorbehandelt, so erhöhte sich die Toxizität von Thiophen, während die von 2-Furamid nicht beeinflußt wurde. Dagegen führte Methylcholanthren-Vorbehandlung zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber 2-Furamid; gleichzeitig war die kovalente Bindung von ^{3}H-2-Furamid an Proteine von Mäuselebermikrosomen in vivo und in vitro vermehrt. Die Bindung in vitro war bei Inkubation ohne NADPH, in einer Stickstoff-Atmosphäre oder unter Kohlenmonoxid (90% CO, 10% O_2) weitgehend unterdrückt.

Die hepatotoxische Wirkung von Brombenzol wurde von Zampaglione et al. (1973) untersucht. Nach der Behandlung von Ratten mit 10 mmol/kg Brombenzol fanden sie eine massive Lebernekrose. Die Empfindlichkeit war gesteigert nach Vorbehandlung mit Phenobarbital. Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren schützte dagegen vor der Lebernekrose; ebenso eine akute Gabe SKF 525A. Fünf Stunden nach Behandlung der Ratten mit Brombenzol (10 mmol/kg

i.p.) sank der Glutathionspiegel der Leber von 7 mmol/l auf 0.5 mmol/l, und zu diesem Zeitpunkt erreichten die kovalenten Bindungen von Brombenzol an Proteine ein Maximum (Gillette et al. 1973). Durch Futterentzug (24 Stunden) erhöhte sich die Toxizität von Brombenzol bei Mäusen (Anstieg der Serum-Transaminasen und der Mortalität); Hypoxie (6% O_2) hatte keinen Einfluß auf die Toxizität von Brombenzol oder Paracetamol (Strubelt et al. 1981). Dies deutet darauf hin, daß die lebertoxische Wirkung von Aromaten andere Wirkungsmechanismen hat als die von CCl_4 (Strubelt et al. 1980). Casini et al. (1985) fanden keine Korrelation zwischen der kovalenten Bindung (in vivo) und der hepatotoxischen Wirkung von Brombenzol gemessen an den Serumtransaminasen. Dagegen fanden dieselben Autoren (1986) eine gute Korrelation zwischen Lipidperoxidation (Malondialdehyd) und den Serumtransaminasen (SGPT).

I.1.4 WEITERE MESSUNGEN ZUR BEURTEILUNG DER HEPATOTOXIZITÄT

Plaa et al. (1958 und 1982) beschrieben die verschiedenen Methoden zur Beurteilung der hepatotoxischen Wirkung der Lebertoxine. Vor allem untersuchten sie die chlorierten Kohlenwasserstoffe wie Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, 1,1,1-Trichlorethan, 1,1,2-Trichlorethan, Trichlorethylen und Tetrachlorethylen. Die Verlängerung der Barbiturat-Schlafzeit als Zeichen des verminderten Abbaus dieser Substanzen nach der Intoxikation mit chlorierten Kohlenwasserstoffen korrelierte mit den Leberschäden, die durch diese Stoffe verursacht wurden. Weitere Methoden wie die Messung der Retentionszeit von Bromsulphalein (BSP) und Bestimmung von LD_{50} wurden als Indizien für eine hepatotoxische Wirkung benutzt. Allerdings ist die Bestimmung der LD_{50} kein gutes Maß für eine Leberschädigung. Daher fanden diese Autoren keine Korrelation zwischen Dosen, die einen leberschädigenden Effekt hervorrufen, und solchen, die den Tod verursachen.

Die Bestimmung von Serumtransaminasen (vor allem SGPT und SGOT) ist die am häufigsten benutzte und allgemein akzeptierte Methode. Der Anstieg von SGPT beispielsweise korreliert mit der Anzahl der nekrotischen Zellen (Hewitt et al. 1980), der Akkumulation von Triglyceriden und der Abnahme der Glucose-6-phosphatase-Aktivität (Traiger und Plaa 1971). In den meisten Fällen wurden die Serumtransaminasen 24 Stunden (und mehr) nach

der Toxin-Gabe bestimmt, weshalb dies nicht viel über die Primärschädigung aussagt.

I.1.5 LEBERTOXIZITÄT VON ETHANOL

Ein noch ungelöstes Problem stellt die lebertoxische Wirkung des Alkohols dar. Eine Beziehung zwischen hohem chronischen Ethanol-Konsum und Lebererkrankungen ist schon lange bekannt. Symptome der Erkrankung sind:

1. Fettleber
2. Alkoholische Hepatitis
3. Leberzirrhose

Eine Fettleber kann auch durch eine einmalige Gabe von Ethanol hervorgerufen werden (Di Luzio und Hartman 1967). Die Akkumulation von Triglyceriden nach chronischem Ethanolkonsum kann man histologisch quantifizieren (Fetttropfen im Cytoplasma), doch ist dies kein entscheidender Faktor in der Ethanol-Toxikologie, da andere Substanzen sowie die Menge der mit der Nahrung aufgenommenen Fette den Vorgang stark beeinflussen (Goheen et al. 1981).

Die alkoholische Hepatitis wird als Vorstufe zur Zirrhose angesehen. Sie ist charakterisiert durch Leberzellnekrosen und eine entzündliche Reaktion.

Die Nekrose konzentriert sich in den meisten Fällen auf die Zentrallobulärregion. Fibrose und Zirrhose sind das Endstadium der alkoholischen Lebererkrankung.

I.1.5.1 ETHANOLSTOFFWECHSEL

Ethanol verteilt sich in der Körperflüssigkeit; die Elimination erfolgt durch Metabolisierung (90%); nur ein kleiner Teil (10%) wird durch Niere und Lunge unmetabolisiert ausgeschieden. Die Metabolisierung findet hauptsächlich in der Leber statt. Ethanol wird dort im Cytoplasma durch Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd metabolisiert. Acetaldehyd wird zu Acetat oxidiert durch das Enzym Aldehyddehydrogenase, das in den Mitochondrien und im Cytosol lokalisiert ist. Über 70 Prozent des Acetats gelangen ins Blut, werden von den peripheren Organen extrahiert und als energieliefern-

des Substrat zu CO_2 weiteroxidiert. Die Aktivität der Alkoholdehydrogenase ist nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Alkohol-Abbau, sondern die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der Bereitstellung des Kofaktors NAD ab, die durch Reoxidation von NADH in den Mitochondrien erfolgt. Da NADH Membranen nicht passieren kann, gelangt es in Form enzymatischer 'Shuttle'-Prozesse, welche sehr wahrscheinlich für die Oxidation von NADH die limitierenden Schritte sind, in die Mitochondrien (Cherrick und Leevy 1965).

Lieber und DeCarli (1968) fanden, daß Lebermikrosomen Ethanol in vitro metabolisieren können. Sie nannten das System 'microsomal ethanol oxidizing system' (MEOS). Dieses System ist im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen lokalisiert und durch Ethanol und verschiedene Pharmaka induzierbar. Als Kofaktor wird NADPH benötigt. Das System kann durch Kohlenmonoxid gehemmt werden. Es ist allerdings noch umstritten, ob dieses System auch in vivo eine Rolle spielt. Sollte dies zutreffen, dann kann dieses System wahrscheinlich nur bis zu 15 Prozent der Ethanolmenge metabolisieren; der Hauptanteil wird durch die Alkoholdehydrogenase abgebaut. Bei chronischem Ethanolkonsum werden Enzyme induziert, die für den Abbau mancher Arzneimittel verantwortlich sind (Khanna et al. 1976); dazu gehört beispielsweise die N-Demethylase-Aktivität (Mitchell et al. 1982). Dadurch kommt es in manchen Fällen zu einer verminderten Arzneimittelwirkung. Das Gegenteil aber - eine verstärkte Wirkung von Medikamenten - wird auch beobachtet, da Ethanol den Abbau verschiedener Arzneimittel über das Cytochrom P-450-System hemmen kann (Schüppel 1969).

I.1.5.2 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN ALKOHOLEN UND ANDEREN HEPATOTOXINEN

a) nach chronischer Gabe

Der Einfluß von chronischer Ethanolbelastung mit verschiedenen Diäten wurde von zahlreichen Autoren untersucht. Khanna et al. (1976) studierten den Einfluß von chronischem Ethanol innerhalb eines Monates bei Ratten, die entweder eine fettreiche oder eine fettarme Flüssigdiät erhielten. Sie fanden einen signifikanten Anstieg des Lebergewichtes sowie einen Anstieg des Gehaltes an Proteinen der Mikrosomen und der Aktivität der Lebermikro-

somen. Diese Ergebnisse waren eine Bestätigung für die Arbeit von Lieber et al. (1972), die Ratten 5 Wochen lang mit Ethanoldiät gefüttert hatten. Sie fanden bei diesen Ratten eine vermehrte Aktivität von Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und Aminopyrin-Demethylase. Diese Ergebnisse wurden zum Teil von Rush et al. (1982) bestätigt. Nach chronischer Ethanolbehandlung fanden Luoma und Vorne (1976) einen Anstieg der Aktivität von Glucose-6-phosphatdehydrogenase. Mitchell et al. (1982) zeigten, daß Cytochrom P-450 durch chronisches Ethanol induzierbar ist, gemessen an einer erhöhten Eliminationsgeschwindigkeit von Aminopyrin und Antipyrin; dagegen wurde P-448 nicht induziert: Die Elimination von Phenacetin und Koffein wurde nicht beschleunigt. Gadeholt (1984) fand, daß durch Ethanol induzierbares Cytochrom P-450 in vitro empfindlicher gegenüber der destruktiven Wirkung von CCl_4 ist als diejenigen Cytochrome, die durch Phenobarbital oder β-Naphthoflavon induzierbar sind.

Hepatocyten von Ratten, die chronisch mit Ethanol behandelt wurden, produzierten mehr Malondialdehyd als Hepatocyten von Kontroll-Ratten. Gegenüber Bromtrichlormethan waren solche Zellen empfindlicher als die Kontroll-Zellen in Bezug auf die Lipidperoxidation und den Austritt von Glutamatdehydrogenase (Remmer et al. 1977).

In dieser Untersuchung induzierte chronische Ethanolbehandlung die Mikrosomenenzyme der Leber nicht. Zu diesem Ergebnis kamen auch Strubelt et al. (1978). Nach chronischer Behandlung von Ratten mit 5 oder 15% (v/v) Ethanollösung für 1, 2 oder 3 Wochen stieg der Proteingehalt der Lebermikrosomen nicht an; die Aktivität der Anilin-Hydroxylase war nur in Mikrosomen aus Lebern von Ratten, die 15%ige Ethanollösung erhalten hatten, erhöht. Trotzdem stieg die Toxizität von CCl_4 bei beiden Gruppen an (gemessen an SGOT, SGPT und Sorbit-Dehydrogenase).

Bis jetzt gibt es keine schlüssige Theorie, über welchen Wirkungsmechanismus chronisches Ethanol die Leber schädigt. Hintze und Remmer (1981) fanden, daß Ratten, die Alkohol chronisch erhielten, eine große Menge an Methan produzieren. Dieses Methan stammte aus Bakterien, die den Darm dieser Ratten besiedelten. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, daß solche Bakterien beim Alkoholabbau bestimmte Toxine ausscheiden, die die Leber schädigen, doch gibt es hierfür bislang keinen Beweis.

b) nach akuter Gabe

Die Verstärkung der Toxizität von CCl_4 durch Alkohol, Ketone und andere Stoffe wurde von vielen Autoren untersucht. Cornish und Adefuin (1966, 1967) untersuchten die Wirkung von akutem Ethanol und anderen Alkoholen auf die Toxizität von CCl_4. Sie fanden, daß diese Alkohole unterschiedlich wirken. Methanol, Ethanol, Isopropanol, sec-Butylalkohol und tert-Butylalkohol verstärkten die Toxizität von CCl_4. Diese Alkohole wurden 16 bis 18 Stunden vor der CCl_4-Inhalation gegeben. Hingegen fand sich keine erhöhte Toxizität, wenn Ethanol zwei Stunden vor der CCl_4-Inhalation gegeben wurde. Dieses Ergebnis wurde später von Traiger und Plaa (1971) bestätigt.

Traiger und Plaa (1971) untersuchten den Einfluß von Ethanol und Isopropanol auf die Toxizität von CCl_4; sie fanden ähnliche Resultate wie Cornish und Adefuin (Anstieg von SGPT, Abfall der Glucose-6-phosphatase und Akkumulation von Triglyzeriden) (siehe Tabelle 1). Isopropanol (2,5 ml/kg) verstärkte den hepatotoxischen Effekt von CCl_4 erheblich mehr als Ethanol (5 ml/kg).

Tabelle 1: Effect of alcohol pretreatment on CCl_4-induced hepatotoxity in rats (N=10)

Treatment	SGPT (units/ml)	Triglycerides (mg/g liver)	Glucose-6-phosphatase activity (mg Pi/g liver/20min.)
Ethanol 5ml/kg	50	8	6,7
Isopropanol 2,5ml/kg	50	6	6,2
CCl_4 0,1ml/kg	100	9	6,0
CCl_4 1,0ml/kg	500	17	3,8
Isopropanol + CCl_4 0,1ml/kg	22 500	22	2,8
Ethanol + CCl_4 0,1ml/kg	500	13	4,8

The alcohol was given (p.o.) 18 hr befor CCl_4 administration (i.p.); liver functions was assessed 24 hr after CCl_4 administration. (Adapted from Traiger and Plaa).

Strubelt et al. (1978) machten die gleiche Untersuchung, aber mit anderen Hepatotoxinen (nämlich mit Thioacetamid, Paracetamol, Allylalkohol, Brombenzol, Phalloidin, α-Amanitin und Praseodym). Die Toxizität von CCl_4, Thioacetamid und Paracetamol wurde durch akute Gabe von Ethanol erhöht, nicht aber die von Brombenzol, Allylalkohol, Phalloidin, α-Amanitin und Praseodym. Die Autoren führen zur Erklärung an, daß die 3 letztgenannten Stoffe nicht in der Leber zu toxischen Zwischenprodukten metabolisiert werden. Tatsächlich werden die meisten Hepatotoxine, deren Toxizität durch die Vorbehandlung mit Ethanol erhöht wird, erst in der Leber gegiftet. Dies gilt insbesondere für CCl_4 (Slater 1966), Trichlorethylen (Allemand et al. 1978), Chloroform (Scholler 1968), Thioacetamid (Ammon et al. 1967) Dimethylnitrosamin (Shank et al. 1975) und Paracetamol (Mitchell et al. 1973).

Da Aceton die hepatotoxische Wirkung von CCl_4 erhöht, spekulierten Traiger und Plaa (1972), daß nicht die Alkohole selbst, sondern die Ketone, die durch ihre Oxidation entstehen, für die Erhöhung der Toxizität von CCl_4 verantwortlich sind. Dieselben Autoren fanden folgerichtig auch, daß Aceton in der Lage ist, die Toxizität von CCl_4 zu potenzieren. Aceton und Isopropanol verstärkten auch die Toxizität von anderen Chlorkohlenwasserstoffen (Chloroform und 1,1,2-Trichlorethan) bei Mäusen. Traiger und Bruckner (1976) untersuchten den Einfluß von 2-Butanol und seinem Metaboliten 2-Butanon auf die Toxizität von CCl_4. Sie kamen zu analogen Ergebnissen wie bei Isopropanol und seinem Metaboliten Aceton.

Sato et al. (1981) untersuchten die Wirkung verschiedener Dosen Ethanol auf die Metabolisierung von Benzol, Toluol, Styrol, Chloroform, CCl_4, 2,2-Dichlorethan, 1,1-Dichlorethylen und Trichlorethylen. Sie fanden, daß die Metabolisierung dieser Stoffe - außer CCl_4 - in vitro durch Ethanol kompetitiv gehemmt wird. In vivo dagegen fanden diese Autoren eine erhöhte metabolische Rate, wenn Ethanol 18 Stunden vor Toxin-Gabe injiziert wurde.

Die durch Ethanol verstärkte Toxizität war erst 20 Stunden nach CCl_4-Inhalation und 36 Stunden nach Ethanol-Gabe am höchsten. Maling et al. (1975) untersuchten den Einfluß von akutem Ethanol auf die Toxizität von CCl_4, Thioacetamid und Dimethylnitrosamin. Bei allen drei Toxinen wurde die Toxizität erhöht (gemessen an SGPT). Die Bindung von markiertem CCl_4, $CBrCl_3$ und $CHCl_3$ an Lipide und Proteine wurde durch Vorbehandlung mit Ethanol signifikant verstärkt. Teschke et al. (1984) fanden, daß die

gleichzeitige Behandlung mit Ethanol und CCl_4 die Toxizität von CCl_4 erhöht. Sie benutzten aber eine relativ große Dosis CCl_4 (1.5 ml/kg); in diesem Fall widersprechen diese Ergebnisse den früheren Behauptungen, daß erst, wenn Ethanol 16-18 Stunden vor CCl_4 gegeben wird, eine erhöhte Toxizität zu erzielen ist. Sato und Lieber (1981) kamen zu dem gleichen Schluß: Sie behandelten Ratten mit zwei verschiedenen Dosen CCl_4 6 Stunden nach der Vorbehandlung mit Ethanol (6 g/kg). Dabei fanden sie eine erhöhte Toxizität bei diesen Ratten, gemessen an dem Anstieg der Serum-Transaminasen; ebenfalls war ein starker Abfall des Glutathionspiegels zu beobachten, während der Gehalt an Cytochrom P-450 unverändert blieb. Auch daran läßt sich sehen, daß das Ethanol selbst an der Verstärkung der Toxizität von CCl_4 beteiligt ist, während Acetaldehyd, der Metabolit von Ethanol, nicht die Toxizität von CCl_4 erhöht (Traiger und Plaa 1972).

Umgekehrt schützt akute Gabe von Ethanol vor der toxischen Wirkung von Paracetamol (Sato und Lieber 1981). Vorbehandlung mit Ethanol (6 g/kg) sechs Stunden vor der Paracetamol-Behandlung (0.5-1.0 g/kg) verminderte bei Ratten die toxischen Wirkungen des Paracetamols, gemessen an den Transaminasen, GSH, Cytochrom P-450 und der Histologie. In vitro hemmte Ethanol die Bindung von Paracetamol an Proteine, allerdings nur in hohen Konzentrationen (50 mM). In vivo wurden Parameter des Arzneimittel-Metabolismus nicht beeinflußt: Weder der Gehalt an Cytochrom P-450 noch die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase wurden durch Ethanol-Vorbehandlung verändert.

24 Stunden nach einer akuten Ethanol-Gabe (170 mmol/kg) fand Powis (1975) keine Zunahme der Cytochrom-P-450-Konzentration; auch die Aktivitäten von NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase wurden durch Ethanol nicht beeinflußt. Einen Anstieg gab es bei der Anilin-Hydroxylierung; die Aminopyrin-Demethylierung geht auf die Hälfte zurück. Eine Zunahme des Gehaltes an Cytochrom P-450 in den Mikrosomen nach akuter Ethanolbehandlung (6 g/kg) wurde von Pennington et al. (1978) demonstriert. Die Zunahme von Cytochrom P-450 erreichte ein Maximum bereits 6 Stunden nach der Ethanol-Gabe und ging nach 24 Stunden auf das normale Niveau zurück. Die Abbaugeschwindigkeit von Zoxazolamin hat sich mehr als verdoppelt nach der akuten Behandlung mit Ethanol (4.71 g/kg Ethanol 17 Stunden vor Zoxazolamin-Gabe) (Mallov und Baesl 1972).

Bis jetzt gibt es allerdings noch keine brauchbare Erklärung, warum und wie Ethanol die Toxizität mancher Hepatotoxine wie CCl_4, Paracetamol,

Thioacetamid und Dimethylnitrosamin potenziert. Daß Ethanol (6 Stunden vor Toxin-Gabe) die toxische Wirkung von CCl_4 potenziert und die von Paracetamol schwächt, liegt wahrscheinlich daran, daß Ethanol manche Isoenzyme der Monooxygenase induziert und andere hemmt, die für die Produktion von toxischen Metaboliten verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang ist zu fragen, ob nicht umgekehrt die Anwesenheit von CCl_4 die Ethanolabbauleistung der Leber reduziert und damit die Ethanolkonzentration in der Leber erhöht. In vitro spielt das 'microsomal ethanol oxidizing system' (MEOS) die entscheidende Rolle beim Ethanolabbau. Khanna et al. (1971) und Ohmiya (1977) behandelten in vitro Rattenlebermikrosomen mit CCl_4 und fanden danach eine dramatische Erniedrigung der Aktivität von MEOS. In vivo zeigte eine CCl_4-Vorbehandlung jedoch keinen Einfluß auf den Ethanolabbau. Auch die Alkoholdehydrogenase (ADH) wurde durch CCl_4-Vorbehandlung unbeeinflußt gelassen.

I.2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwiefern Abbauprozesse indirekter Hepatotoxine bei Erhöhung der Dosis bzw. unter bestimmten Bedingungen mit denen direkter Hepatotoxine vergleichbar sind. Dazu wurden Experimente zur Toxizität von CCl_4 einerseits und verschiedenen Aromaten und Ethanol andererseits durchgeführt. Als Indikator der Leberschädigung diente die Exhalatin von Alkanen und Alkenen. Sie wurden nach einem im hiesigen Institut verbesserten Verfahren gemessen. Die Ergebnisse sollten einen Eindruck vermitteln, ob das Verfahren der quantitativen Messung verschiedener Kohlenwasserstoffe in der Atemluft von Versuchstieren zum Beurteilen toxischer Wirkungen Vorteile bietet und als Routineverfahren geeignet ist. Dabei war jedoch davon auszugehen, daß Nager auch unter physiologischen Bedingungen geringe Mengen flüchtiger Kohlenwasserstoffe exhalieren. Pro kg Körpergewicht sind es einige Nanomole während einer Stunde. Die gemessenen Werte sind niedriger als die im Körper gebildeten Mengen (Frank et al. 1980a), da Alkane und Alkene in der Leber oxidiert werden (Frommer et al. 1970, Tsukamoto et al. 1985). Qualitativ sind es die gleichen Gase, die auch vermehrt abgeatmet werden, wenn bekannte Auslöser der Lipidperoxidation wie CCl_4 den Tieren appliziert werden (Remmer et al.

1984). Wegen der oxidativen Metabolisierung der Gase kann eine mäßige Erhöhung ihrer Abatmung auch Folge der Hemmung ihres Abbaus sein und darf folglich nicht unbedingt als Zeichen einer verstärkten Lipidperoxidation gedeutet werden (Frank et al. 1980a). Daher wurde nicht nur die Wirkung bekannter toxischer Pharmaka untersucht, sondern auch der Einfluß von Ernährung und Alkohol auf die Abatmung flüchtiger Kohlenwasserstoffe geprüft.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

Chemikalien und Biochemikalien

Ethanol	Merck
3-Methylcholanthren	Aldrich
Phenobarbital + Natrium	Fluka
Paracetamol	Merck
2-Furamid (Fura-2-Carbonsäureamid)	EGA
Thiophen	EGA
Atemkalk (Drägersorb)	Dräger (Lübeck)
Rinderserumalbumin	Behring-Werke
Phenolreagenz	Merck
Tetrachlormethan (CCl_4)	Merck
L-Leucin	Merck
Dimethylsulfoxid	Merck
Glucose-6-phosphat	Boehringer (Mannheim)
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	Boehringer (Mannheim)
Brombenzol	Riedel-deHaën
NADP (β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat) Dinatriumsalz, Grad II, 98%	Boehringer (Mannheim)
NAD (β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid)	Boehringer (Mannheim)
DL-Ethionin	Sigma
Eisensulfat	Merck, Darmstadt
Fesoy	Merck, Darmstadt
Malondialdehyddiethyldiacetal	Merck-Schuchard
L-Methionin	Merck
L-Cystein	Sigma
Acetylsalicylsäure	Merck
Diethylmaleat (Maleinsäurediethylester)	Merck-Schuchardt

Laborgase: Messer Griesheim (Düsseldorf)

Stickstoff 99,996%

Synthetische Luft (Kohlenwasserstoff-frei)

Wasserstoff 99,999%

Sauerstoff 99,995%

Isobuten 9,5% (Rest Stickstoff) Linde (Unterschleißheim)

Eichgas:

enthält 0.5 ppm Methan, Ethan, Ethylen, Propan, n-Butan, n-Pentan und i-Buten.

2,2 METHODEN

2,21 In vivo - Experimente

Die Experimente wurden mit geschlechtsreifen, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Körpergewicht 150-200g) und weiblichen NMRI-Mäusen (20-30g) durchgeführt. Alle Tiere stammten aus der Versuchstierzuchtanstalt Ivanovas (Kisslegg).

BEHANDLUNG DER TIERE

Vorbehandlung

Die Tiere wurden nach der Anlieferung zunächst mindestens zwei Tage lang zur Akklimatisierung in klimatisierten Räumen (22°C und 60% relative Luftfeuchtigkeit) bei kontrolliertem Tag/Nacht-Rhythmus (12/12 Stunden) gehalten. Sie erhielten, wenn nicht anders vermerkt, pelletiertes Festfutter Altromin C 1320 und Trinkwasser ad libitum. Wenn nicht anders beschrieben, wurde den Tieren 24 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen; sie erhielten aber weiterhin Trinkwasser ad libitum. Zur Induktion mikrosomaler Leberenzyme (P-448 und P-450) wurden die Tiere entweder mit 3 x 100 mg/kg Phenobarbital intraperitoneal (verteilt auf drei Tage) oder mit 3 x 20 mg/kg 3-Methylcholanthren intraperitoneal (verteilt auf drei Tage) be-

handelt. Die letzte Injektion erfolgte zwei Tage vor Versuchsbeginn.

Akute Ethanolbehandlung

Die Tiere erhielten 2-4 g Ethanol (i.p. oder per Schlundsonde) pro kg Körpergewicht als 33%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung zumeist eine Stunde vor Versuchsbeginn. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Kochsalzlösung.

Chronische Ethanolbehandlung

Den Ratten wurde eine 20%ige Ethanollösung, die mit 0,05% Saccharin versetzt war, über einen Zeitraum von 13 bis 39 Tagen ad libitum angeboten. Kontrolltiere erhielten eine zu der Ethanollösung isokalorische Saccharoselösung (26.9%) als Trinkflüssigkeit.

Weitere Behandlungen

Tetrachlormethan wurde unverdünnt in verschiedenen Dosen intraperitoneal eine Stunde vor Beginn der Messung appliziert. Paracetamol und 2-Furamid wurden in Kochsalzlösung gelöst und i.p. injiziert. Thiophen wurde in Olivenöl gelöst und ebenfalls i.p. verabreicht.

Diät-Ratten

Die Ratten erhielten 13 bis 39 Tage lang Diät I oder Diät II:

Diät I		Diät II	
Casein	22%	Casein	22%
Stärke DAB	46%	Stärke DAB	46%
Saccharose	10%	Saccharose	10%
Maisöl	***10%***	***Fischöl***	***10%***
Cellulosepulver	4%	Cellulosepulver	4%
Mineralien und Spurenelemente	6%	Mineralien und Spurenelemente	6%
Vitamine	2%	Vitamine	2%
	100%		100%

Maisöl enthält hauptsächlich ω-6-Fettsäuren (55% Linolsäure), dagegen enthält Fischöl hauptsächlich ω-3 Fettsäuren. Bei Ratten, die mit einer Mais- oder Fischöldiät gefüttert werden, spiegelt sich nach 10-15 Tagen das Verhältnis an ungesättigten Fettsäuren in beiden Diäten in der Fettsäurezusammensetzung der mikrosomalen Lipide wieder (Hammer und Wills 1978).

EXSIKKATORSYSTEM ZUR BESTIMMUNG VON ABGEATMETEN KOHLENWASSERSTOFFEN

Zum Sammeln der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe wurde je eine Ratte bzw. eine oder zwei Mäuse in ein Ganzglasexsikkatorsystem nach Bolt et al. (1976) mit einem Innenvolumen von 800 ml gesetzt (siehe Abb. 2). Am Boden befanden sich 80 g Atemkalk zur Absorption des von den Tieren produzierten CO_2. Die Tiere saßen über dem Atemkalk auf einer gelochten Porzellanplatte.

Ein mit kohlenwasserstofffreiem Sauerstoff gefülltes Spirometer lieferte kontinuierlich die verbrauchte Gasmenge nach. Die Gasproben wurden durch ein PTFE-beschichtetes Gummiseptum mit einer gasdichten 10 ml Einmalspritze entnommem. Die durch die entnommenen Proben entstandenen Volumenverluste wurden durch die gleiche Menge synthetischer Luft ersetzt. Vor dem Versuch wurde das System fünf Minuten lang mit kohlenwasserstofffreier Luft gespült.

EXSIKKATORSYSTEM ZUR BESTIMMUNG DES ABBAUS VON KOHLENWASSERSTOFFEN

In diesen Versuchen betrug das Exsikkatorvolumen 2 600 ml. Es wurden pro Exsikkator 4 bis 6 Mäuse eingesetzt. Die Probeentnahme erfolgte alle 30 Minuten. Am Boden befanden sich 100 g Atemkalk sowie ein Magnetrührer,der für die Umwälzung des Gasraumes sorgte.

Zur Bestimmung der Aufnahme und Metabolisierung von Kohlenwasserstoffen durch Labortiere wurde mit einer Einmalspritze 10 ml Gas aus einer Vorratsflasche entnommen und über eine 20 cm lange Kanüle durch das Septum injiziert. Danach wurde die erste Gasprobe für die Gaschromatographie entnommen.

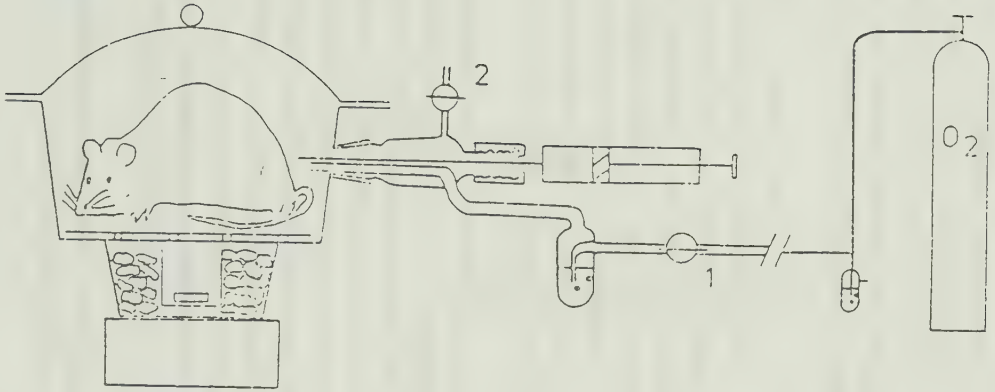

Abbildung 2: Ganzglasexsikkatorsystem zur Kollektion von Atemgasen nach Bolt et al., 1975 (1: Sauerstoffzufuhr, 2: Lüftungsventil)

GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON ALKANEN

Zur Bestimmung der Alkane in den Gasproben diente ein Gaschromatograph Modell Fractovap 2150 der Firma Carlo Erba. Kleine Gasproben wurden mit Hilfe einer 1-ml-Spritze (Hamilton) direkt durch das Septum injiziert. Größere Proben wurden mit einer 10-ml-Spritze entnommen und über ein Sechswegeinlaßventil mit 6 ml fassender Probensammelschleife in den Gaschromatographen eingegeben. Dabei dienten die ersten 4 ml zum Ausstoßen von in das Probeneinlaßventil eingedrungenen Verunreinigungen; die restlichen 6 ml verblieben in der Sammelschleife und wurden mit dem Trägergasstrom auf die Säule gespült.

Die Trennung der einzelnen Gase erfolgte auf einer Porasil C 100-120 mesh Säule (Frank et al. 1980a, 1980b) in einer Edelstahlröhre (3 mm Durchmesser, 5 m Länge) bei 60°C isotherm mit Stickstoff als Trägergas (30 ml pro Minute), das vor dem Eintritt in die Säule beim Durchströmen einer Natriumsulfat-Dekahydrat-Säule angefeuchtet wurde. Der Flammenionisationsdetektor wurde bei 130°C mit 30 ml Wasserstoff und 500 ml synthetischer Luft pro Minute betrieben. Die Trennung erfolgte nach Molekulargewicht, Wasserstoffsättigung und Isomerie. Die Analysezeit betrug 30 Minuten pro Probe.

Die Methanbestimmung erfolgte auf einer Glassäule (3 mm Durchmesser, 3 m Länge) mit Porapak Q (80-100 mesh) bei 40°C isotherm mit Stickstoff (35 ml pro Minute) als Trägergas. Der Flammenionisationsdetektor wurde mit Wasserstoff (30 ml pro Minute) und synthetischer Luft (500 ml pro Minute) bei einer Temperatur von 100°C betrieben. Die erhaltenen Chromatogramme wurden auf Kompensationsschreibern aufgezeichnet und von Hand ausgewertet.

Zur Quantifizierung und Überprüfung des Systems diente ein Eichgasgemisch, welches die Kohlenwasserstoffe in einer Konzentration von 0.3 bis 0.5 ppm enthielt. Das Eichgas wurde vor jedem Versuch injiziert. Zur Identifizierung der einzelnen Gase wurden GC-MS-Messungen durchgeführt (vgl. Frank et al. 1980b).

Das Gaschromatogramm des Eichgases (Abb. 3) und die Chromatogramme der exhalierten Gase nach verschiedenen Intoxikationen (Abb. 4-9) sind im folgenden dargestellt.

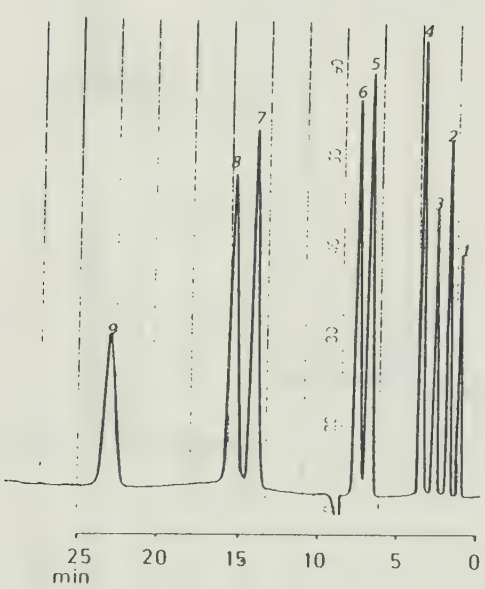

Abbildung 3: Gaschromatographische Auftrennung von 6 ml Eichgasmischung aus flüchtigen Kohlenwasserstoffen (0.5 ppm) auf einer Porasil-C-Säule (5 m × 3 mm) bei 60°C isotherm. Flammenionisationsdetektor, Dämpfung des Elektrometers: ×32

1 = Methan 2 = Ethan 3 = Ethylen 4 = Propan 5 = i-Butan
6 = n-Butan 7 = i-Pentan 8 = n-Pentan 9 = i-Buten

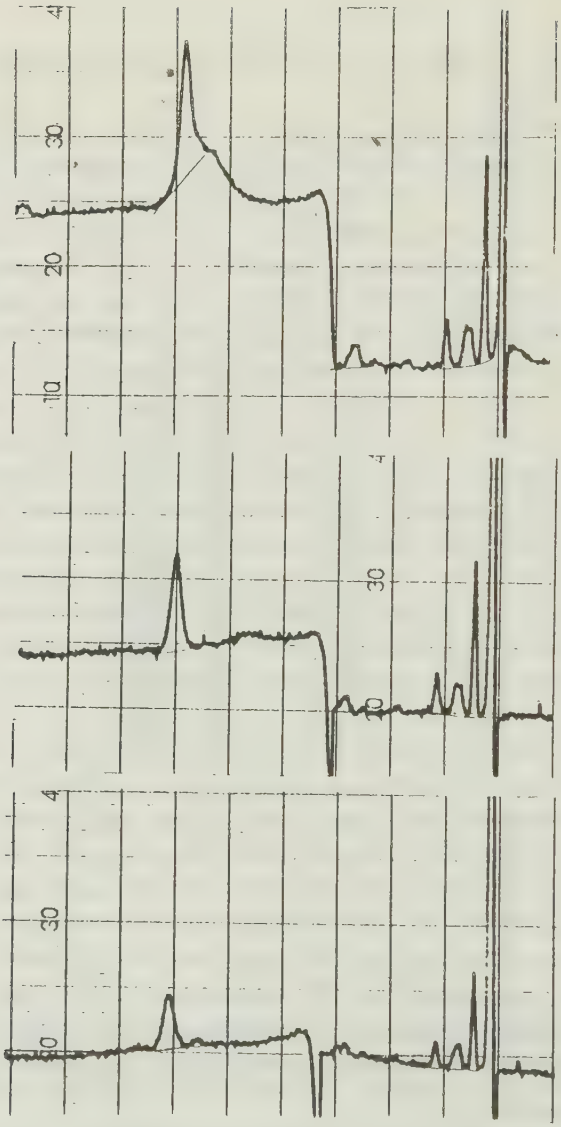

Abbildung 4: Gaschromatographische Auftrennung einer Luftprobe aus dem Gasraum des Ganzglasexsikkatorsystems, das mit zwei weiblichen NMRI-Mäusen, die eine Stunde vorher mit 0,4 ml/kg CCl_4 behandelt worden waren, besetzt war.

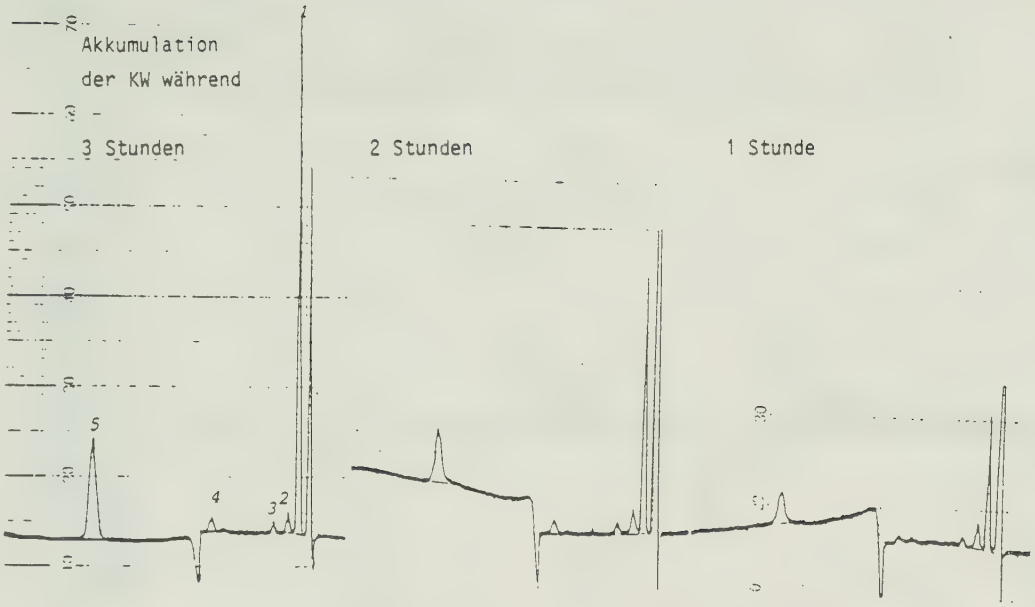

Abbildung 5: Gaschromatographische Auftrennung einer Luftprobe aus dem Gasraum des Ganzglasexsikkatorsystems, das mit zwei gehungerten (50 Stunden) weiblichen NMRI-Mäusen, die eine Stunde vorher mit 0,5 g/kg Paracetamol behandelt worden waren, besetzt war.
1 = Ethan 2 = Ethylen 3 = Propan 4 = n-Butan 5 = n-Pentan

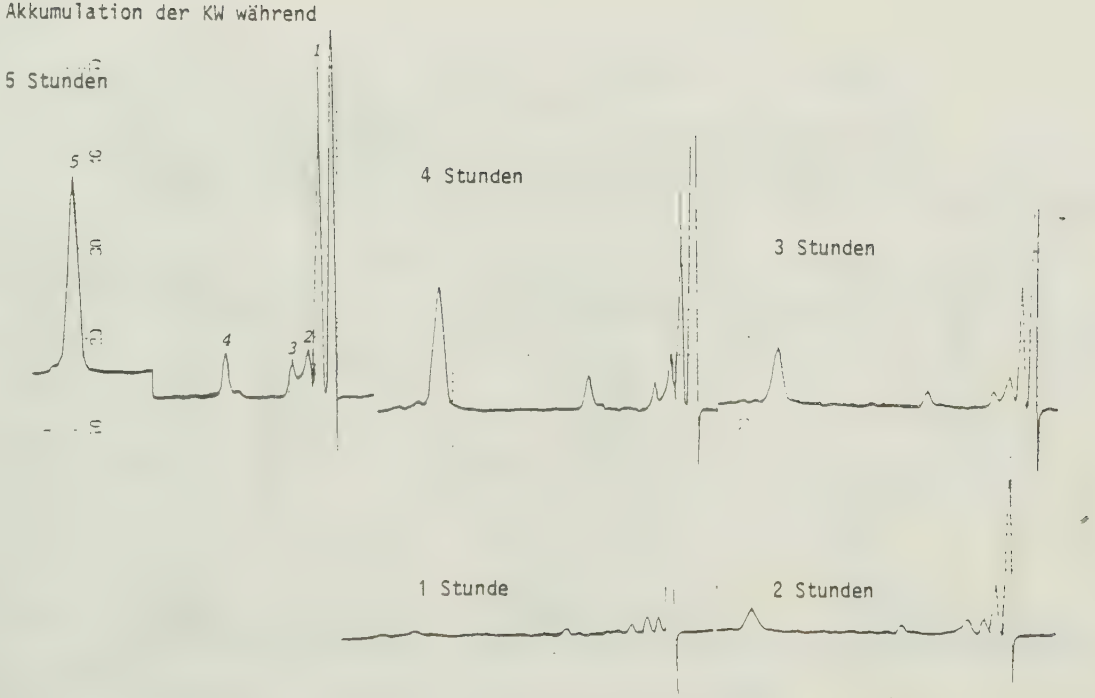

Abbildung 6: Gaschromatogramme von Proben aus dem Gasraum des Exsikkators, der zwei gefütterte und mit Phenobarbital induzierte weibliche NRMI-Mäuse enthielt, die eine Stunde vor der Messung mit 250 mg/kg 2-Furamid behandelt worden waren.
1 = Ethan 2 = Ethylen 3 = Propan 4 = n-Butan 5 = n-Pentan

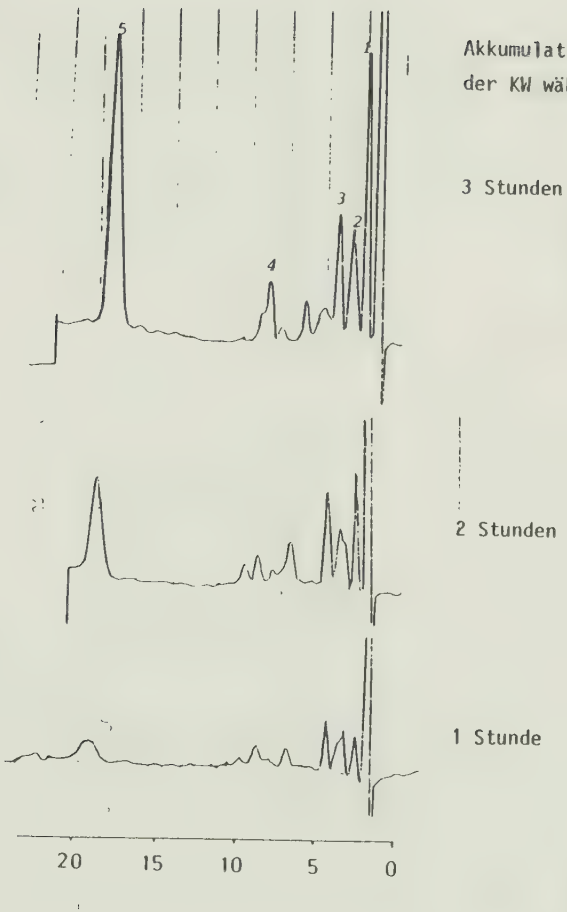

Abbildung 7: Gaschromatogramme von Proben aus dem Gasraum des Exsikkators, der eine gehungerte (24 Stunden) weiblich SIV-Ratte (Phenobarbital-induziert) enthielt, die eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion eine Dosis 2-Furamid von 300 mg/kg erhalten hatte.
1 = Ethan 2 = Ethylen 3 = Propan 4 = n-Butan 5 = n-Pentan

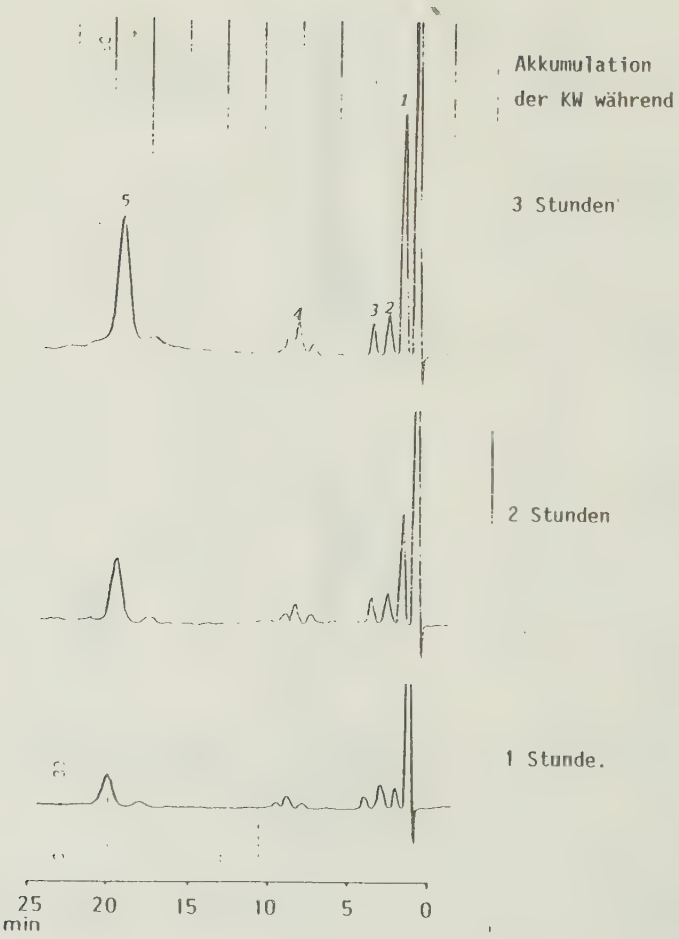

Abbildung 8: Gaschromatogramme von Proben aus dem Gasraum des Exsikkators, der zwei gefütterte weibliche NMRI-Mäuse (mit Phenobarbital induziert und mit 300 mg/kg Thiophen eine Stunde vor der Gaskollektion behandelt) enthielt.
1 = Ethan 2 = Ethylen 3 = Propan 4 = n-Butan 5 = n-Pentan

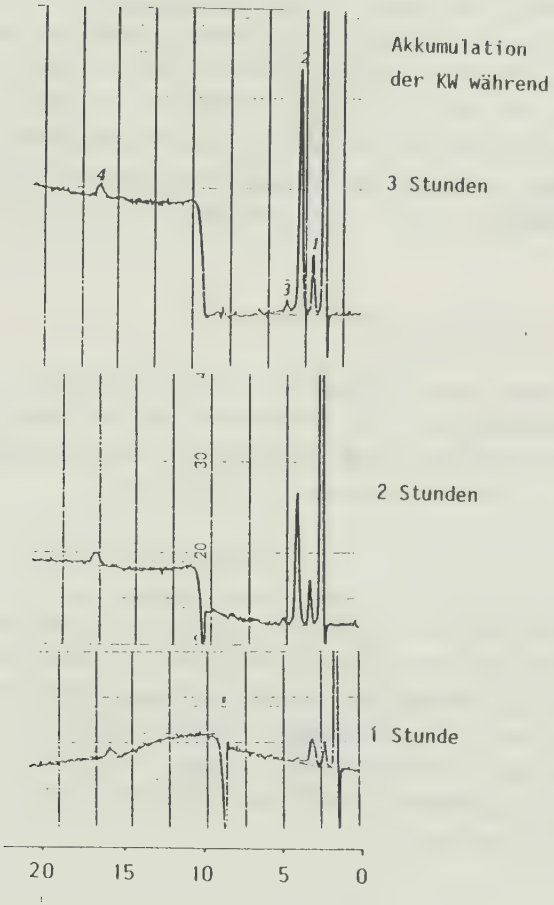

Abbildung 9: Gaschromatogramme von Proben aus dem Gasraum des Exsikkators, der zwei weibliche NMRI-Mäuse enthielt, die eine Stunde vor der Gaskollektion mit Ethionin (1 g/kg) behandelt worden waren.
1 = Ethan 2 = Ethylen 3 = Propan 4 = n-Pentan

PHARMAKOKINETISCHE ANALYSE

Für die Bestimmung der Elimination von Kohlenwasserstoffen wurde das Modell von Filser und Bolt (1979) übernommen. Gasraum und Tier bilden dabei ein abgeschlossenes System (vgl. Abb.1), wobei zu Beginn des Experiments (t=0) die gesamte Kohlenwasserstoffmenge sich im Gasraum befindet, während sich nach einer bestimmten Zeit ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration im Gasraum und jener im Tier einstellt. Die zugehörige Gleichgewichtskonstante wird mit K_{eq} bezeichnet und ergibt sich folglich zu:

(1) $$K_{eq} = C_1 / C_2$$

wobei C_1 die Konzentration im Gasraum, C_2 die Konzentration im Tier ist. Da das System abgeschlossen ist, gilt weiterhin, daß die Konzentration C_o, die zu Versuchsbeginn im Gasraum vorzufinden ist, sich zum Versuchsende entsprechend der Gleichgewichtskonstanten verteilt hat:

(2) $$V_1 \times C_o = C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2$$

V_1 und V_2 sind dabei das Volumen des Gasraumes bzw. das Volumen des Tieres (wobei als brauchbare Näherung die Dichte des Tieres gleich 1 gesetzt wird, also das Gewicht ein direktes Äquivalent zum Volumen bildet). Damit sind die beiden Volumina bekannt. C_o und C_1 lassen sich im Gasraum zu Beginn bzw. Ende des Experimentes bestimmen, weshalb es nichtinvasiv möglich ist, C_2 zu errechnen. Durch Einsetzen von (2) in (1) läßt sich deshalb auch K_{eq} bestimmen:

(3) $$K_{eq} = \frac{V_1 (C_o - C_1)}{V_2 \times C_1}$$

Beim metabolischen Abbau von Kohlenwasserstoffen handelt es sich um eine Pharmakokinetik der 1. Ordnung. Das das theoretische Ende des Experiments ($t=\infty$) in die Praxis nicht umgesetzt werden kann, wird ersatzweise durch Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten eine Eliminationskurve aufgenommen, aus der sich mit einem Rechnerprogramm oder graphisch in einer halbloga-

rithmischen Darstellung die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ ergibt. Die Clearance C auf 1kg Körpergewicht bezogen ergibt sich dann zu:

$$C = \frac{(V_1 + K_{eq} \times V_2) \times \ln 2}{B \times t_{1/2}} \qquad (4)$$

wobei B das Gewicht des Tieres ist. Nun läßt sich noch die oben genannte Festsetzung der Dichte gleich 1 (um einen Wert für V_2 zu erhalten) dadurch umgehen, daß (3) in (4) eingesetzt wird, wobei sich V_2 herauskürzt:

$$C = \frac{V_1 \ (1 + (C_o - C_1)/C_1) \ \ln 2}{B \times t_{1/2}} \qquad (5)$$

Die kinetischen Größen der metabolischen Elimination ließen sich durch die Messung der Kohlenwasserstoffkonzentration im Gasraum über die Zeit von 4 Stunden bestimmen; die Probenentnahme erfolgte alle 30 Minuten. Dabei wurden die Gaskonzentrationen bzw. Gasmengen bei den Expositionsversuchen im allgemeinen in ppm, bei Exhalationsversuchen in nanomol/kg Körpergewicht × Stunden angegeben.

2.2.2 In vitro - Experimente

PRÄPARATION VON MÄUSELEBERMIKROSOMEN

Mäuselebermikrosomen wurden nach der Methode von Potter et al. (1973) präpariert. Dazu wurden NMRI-Mäuse 24 Stunden nüchtern gehalten und durch cervikale Dislokation mit anschließendem Ausbluten getötet. Nach Eröffnung des Abdomen wurde die Leber exzidiert und in eiskalter Tris-KCl-Lösung (4 Teile KCl 1.15%ig und 1 Teil Tris-HCl 0.25 M; pH 7.5) überführt. Danach wurde die Leber in neuer Tris-KCl-Lösung (5 Teile pro Gramm Leber) mit der Schere zerkleinert. Die Teile wurden unter Eiskühlung im Potter-Homogenisator homogenisiert und danach 20 Minuten lang bei 10 000 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach Entfernung der oben schwimmenden Fettschicht 60 Minuten in der Ultrazentrifuge bei 105 000 xg zentrifugiert. Der Niederschlag wurde erneut in Tris-KCl-Lösung aufgenommen und noch einmal 60 Minuten lang bei 105 000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in soviel 0.1 M Phosphatpuffer suspendiert, daß 1 ml Suspension 8.3 mg mikrosomales Protein enthielt.

AUSLÖSUNG DER LIPIDPEROXIDATION IN MIKROSOMENINKUBATION

Für die Experimente wurden Headspace-Gläser (20 ml Volumen) verwendet, die während der Inkubationsdauer mit teflonkaschierten Butylgummikappen verschlossen gehalten wurden. Jeder Inkubationsansatz enthielt 1.0 ml Mikrosomensuspension (8.3 mg Protein pro ml) und 2.5 ml Phosphatpuffer. Dieser

Ansatz wurde zunächst 5 Minuten lang bei 37°C im Schüttelbad inkubiert und mit kohlenwasserstofffreiem Gasgemisch (synthetischer Luft) durchperlt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml 1.15%iger KCl-Lösung eingeleitet, die ein NADPH-regenerierenden System (NADP 1.0 µmol, $MgCl_2$ 15 µmol, Glucose-6-phosphat 25 µmol und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase 2 E.U.) enthielt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Headspace-Gläser auf Zimmertemperatur abgekühlt. Anschließend wurde durch das Butylgummiseptum 1 ml Gasraum aus dem Inkubationsgefäß entnommen und der gaschromatographischen Analyse zugeführt (Direktinjektion auf eine Porasil-C-Säule).

PRÄPARATION VON MÄUSELEBERHOMOGENAT

Die Leber wurde gewonnen und homogenisiert wie oben beschrieben. Die Zentrifugation in der Kühlzentrifuge erfolgte 20 Minuten bei 20 000 Upm. Der Überstand diente nach Entfernung der oben schwimmenden Fettschicht zur Inkubation.

PROTEINBESTIMMUNG

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode von Lowry et al. (1951) angewandt. Zu 0.5 ml Protein-Suspension, die vorher 1:100 verdünnt worden war, wurden 0.5 ml 1N NaOH und 5.0 ml alkalisches Kupfer-Reagenz gegeben. Nach 10 Minuten wurden 0.5 ml Phenolreagenz (Merck, unmittelbar vor der Verwendung 1:1 aus der Stammlösung mit bidestilliertem Wasser verdünnt) zu dem Ansatz zupipettiert und sofort geschüttelt. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion des Ansatzes in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke im Zeiss-Spektrophotometer bei 720 nm gegen einen nach derselben Methode behandelten Leerwert gemessen. Die Quantifizierung erfolgte gegen eine Eichkurve, die aus Rinderserumalbumin hergestellt wurde.

BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON GLUTAMAT-OXALACETAT- UND GLUTAMAT-PYRUVAT-TRANSAMINASE IM SERUM (Reitman und Frankel 1957)

Das Serum wurde zuerst 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Zur Bestimmung von GOT

wurden 0.2 ml Serum mit 1 ml einer Lösung aus Phosphatpuffer 0.1 mol/l, pH 7.4, 0.1 mol/l L-Asparat und 2 mmol/L α-Oxoglutarat gemischt.

Zur Bestimmung von GPT wurde das Serum mit 0.1 ml einer Lösung aus Phosphatpuffer 0.1 mol/l, pH 7.4, D,L-Alanin 0.2 mol/l und α-Oxoglutarat 2 mmol/l gemischt.

Danach wurden die Lösungen geschüttelt und bei 37°C im Wasser 1 Stunde für GOT und 30 Minuten für GPT inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (1 mmol/l) versetzt. Nach 20 Minuten wurden 10.0 ml 0.4N NaOH zupipettiert und geschüttelt; nach 5 Minuten wurde die Absorption gemessen (Hg-Lampe 546 nm).

Prinzip

$$\alpha\text{-Oxoglutarat} + \text{L-Asparat} \overset{\text{GOT}}{\rightleftharpoons} \text{L-Glutamat} + \text{Oxalacetat}$$

$$\alpha\text{-Oxoglutarat} + \text{L-Alanin} \overset{\text{GPT}}{\rightleftharpoons} \text{L-Glutamat} + \text{Pyruvat}$$

Die Enzymbestimmungen wurden dadurch ermöglicht, daß die 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Oxalacetat und Pyruvat bei 546 nm eine höhere molare Extinktion haben als das 2,4-Dinitrophenylhydrazon von α-Oxoglutarat.

BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON GLUTAMATDEHYDROGENASE

Zur Bestimmung der Aktivität der Glutamatdehydrogenase im Serum diente MONOTEST®. Die entsprechende Enzymaktivität wurde aus einer Tabelle abgelesen. Die Methode lehnt sich an die Angaben von E. Schmidt an.

Lösungen:

1. NADH/ADP/LDH
2. Puffer/Ammoniumacetat/EDTA
3. α-Oxoglutarat

Zuerst wurde Lösung 2 (2.5 ml) mit Serum (0.5 ml) gemischt und nach 3 Minuten die Extinktion E_1 gemessen. Dann wurde das Gemisch 5 Minuten bei 25°C stehen gelassen und nochmals die Extinktion E_2 gemessen (un-

spezifische Vorreaktion).

Danach wurde Lösung 3 (0.1 ml) zugegeben und die Extinktion E_3 gemessen. 5 Minuten danach wurde die Extinktion E_4 gemessen. Die Extinktionsdifferenz E_1-E_2 wurde von der Extinktionsdifferenz E_3-E_4 abgezogen, woraus sich $\Delta E/5min$ ergibt.

Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt bei 334 nm 6 cm^2 pro Mikromol. (Volumenaktivität = 207 × $\Delta E334/5min$ [U/l])

Endkonzentration im Test:

50 mM Triäthanolamin-Puffer, pH 8.0
100 mM Ammoniumacetat
7 mM α-Oxoglutarat, 1 mM ADP, 0.2 mM NADH, 2.5 mM EDTA
LDH = 2 U/ml

Prinzip

Das Enzym Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die Wasserstoffübertragungs-Reaktion

$$\alpha\text{-Oxoglutarat} + NADH + NH_4^+ \Leftrightarrow Glutamat + NAD^+ + H_2O$$

deren Gleichgewicht weit auf der Seite von Glutamat und NAD^+ liegt. Man bestimmt die Aktivität der GLDH aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH-Abnahme. NADH ist Meßgröße aufgrund seiner Absorption bei 334 nm.

MALONDIALDEHYDBESTIMMUNG

Zur Bestimmung von Malondialdehyd diente die Methode von Smuckler et al. (1967), die später von Reiner et al. (1972) verbessert wurde.

0.5 ml des Inkubationsansatzes mit Mäuselebermikrosomen oder -homogenat wurden mit 1.0 ml Trichloressigsäure (15%) enteiweißt. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge (5 Minuten bei 1000 x g) wurde 1.0 ml Überstand mit 0.5 ml Thiobarbitursäure versetzt und nach Schütteln 10 Minuten im kochenden Wasserbad entwickelt. Nach dem Abkühlen wurde der rote Farbstoff bei 535 nm gegen einen Reagentienleerwert bestimmt. Die

Konzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt, die mit Malondialdehyddiethyldiacetal erstellt worden war. Zugabe von Rinderserumalbumin und nichtperoxidierten Mikrosomen zu Malondialdehyddiethyldiacetal führte zu einer identischen Eichkurve.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

III.1 HEMMENDE UND FÖRDERNDE EFFEKTE AUF DIE HEPATOTOXIZITÄT VON CCl_4 UND PARACETAMOL

III.1.1 Bestimmung des LD_{50} von CCl_4 bei weiblichen SIV-Ratten im Exsikkatorsystem

Die LD_{50} von CCl_4 bei Wistar-Ratten liegt bei 6.4 ml/kg; bei Ratten, die eine proteinfreie Diät erhalten hatten, lag sie bei 14.7 ml/kg (McLean und McLean 1966). Dies war die erste Untersuchung, die bewies, daß Mangel an Protein die Ratten vor der toxischen Wirkung von CCl_4 schützt.

Da die Metabolisierung von CCl_4 durch die mikrosomale Monooxygenase entscheidend für seine toxische Wirkung ist, wurde angenommen, daß bei Proteinmangel die für den Abbau von Fremdstoffen verantwortlichen Membranenzyme vermindert synthetisiert werden. Die Lipidperoxidation als Ursache der toxischen Wirkung von CCl_4 wurde von Recknagel 1967 vorgeschlagen. Die Entstehung von Kohlenwasserstoffen als Folge einer Lipidperoxidation wurde hier als Parameter für die toxische Wirkung verwendet.

Frühere Untersuchungen zeigten, daß Ethan- und Pentanabatmung nach der Intoxikation mit CCl_4 im Dosisbereich 0.1 bis 0.5 ml/kg nicht dosisabhängig verläuft; im darüber liegenden Bereich kam es zu einem deutlichen Anstieg (Remmer et al. 1984).

Auch die Erhöhung der Transaminasen im Serum war zwischen 0.1 und 0.5 ml/kg CCl_4 nicht dosisabhängig (Sato et al. 1981).

Zur Bestimmung der LD_{50} von CCl_4 bei weiblichen SIV-Ratten im Exsikkatorsystem wurden die Ratten mit verschiedenen Dosen (2, 3, 3.5, 3.75 und 4 ml/kg) CCl_4 unverdünnt intraperitoneal injiziert. Eine Stunde nach der CCl_4-Verabreichung wurden die Ratten in die Exsikkatoren gesetzt. Nach einer Stunde wurde mit der Messung der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe (Ethan und n-Pentan) begonnen. Die Mortalität stieg von 25% bei 3.5 ml/kg

auf 100% bei 4 ml/kg und betrug bei 3.75 ml/kg die Hälfte (Tab. 2). Dagegen kam es bei den relativ hohen Dosen nicht zu einer Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen CCl_4 und der Alkanabatmung (Tab. 2). Das heißt, in diesem Fall kam es wahrscheinlich zu einer Sättigung des Enzymsystems, das für den Abbau von CCl_4 verantwortlich ist.

Tabelle 2:

Bestimmung von LD_{50} bei SIV-Ratten in einem geschlossenen Expositionssystem; die Kohlenwasserstoffe wurden zwei Stunden nach der Tetrachlormethangabe und nach nur einer Stunde im Exsikkator bestimmt (Mittelwert ± Standardabweichung). Die Ratten waren 12 Stunden ohne Futter, erhielten aber nach Belieben Trinkwasser.

CCl_4 ml/kg	n-Pentan nMol/kg/h	Ethan nMol/kg/h	Anzahl der Ratten	Mortalität in 2 Stunden
2	68±6	35±5	4	1/4
3	83±13,5	50±13	4	1/4
3,5	75±12	42±7	4	1/4
3,75	87±3	40±7,5	4	2/4
4	60±7	36±7,4	4	4/4

III.1.2 Der Einfluß von Diethylmaleat-Vorbehandlung auf die Lipidperoxidation unter CCl_4

Es wird allgemein angenommen, daß die Toxizität von Verbindungen, die über radikalische Metaboliten wirken, durch Glutathion (GSH) vermindert werden kann, da es in reduzierter Form Radikale abzufangen vermag. Im Tierversuch wir Diethylmaleat oft als GSH-senkendes Mittel benutzt. Dabei ist jedoch der Einfluß von Diethylmaleat-Vorbehandlung auf die Toxizität bzw. die

Lipidperoxidation, die durch CCl_4 hervorgerufen werden können, noch immer umstritten.

Eine additive Wirkung von Diethylmaleat auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation fanden Bechtold et al. (1982), wobei ihnen als Maßstab die n-Pentan-Abatmung diente.

Lindstrom et al. (1978) fanden keinen signifikanten Anstieg der Ethanabatmung als Zeichen einer verstärkten Lipidperoxidation, wenn die Ratten 30 Minuten vor der CCl_4-Gabe mit Diethylmaleat behandelt wurden. Dagegen fand dieselbe Gruppe einen signifikanten Anstieg der Serum-Transaminasen bei gleicher Behandlung wie jene Ratten, die nur CCl_4 erhielten (Anders 1980). Suarez et al. (1981) beobachteten jedoch keine Vermehrung der Serum-Transaminasen.

Da Diethylmaleat die Metabolisierung von CCl_4 beeinflußt (Anders 1978), wurde CCl_4 jetzt bei einer Versuchstiergruppe 2.5 Stunden, bei einer zweiten Gruppe 5 Stunden nach der Diethylmaleat-Behandlung gegeben.

Ratten, die Diethylmaleat 2.5 Stunden vor der CCl_4-Gabe erhalten hatten, exhalierten relativ große Mengen von Ethan (20 nMol/kg in einer Stunde) und n-Pentan (40 nMol/kg in einer Stunde). Die Vorbehandlung der Ratten mit Diethylmaleat 5 Stunden vor der CCl_4-Gabe hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Abatmung von Ethan und n-Pentan im Vergleich zu nur mit CCl_4 behandelten Ratten (Abb. 10). Demnach scheint 5 Stunden nach Gabe von Diethylmaleat die Wirkung auf den GSH-Spiegel abgeklungen zu sein. Ein Hinweis auf eine Hemmung der CCl_4-Giftung ergibt sich bei dieser Versuchsanordnung nicht.

III.1.3 Der Einfluß von Nahrungsentzug und Induktion der Cytochrom-P-450-Monooxygenase auf die Hepatotoxische Wirkung von Paracetamol und Tetrachlormethan

Aromaten werden durch Cytochrome wie P-450 und P-448 metabolisiert; sie erscheinen dann im Urin als Merkapturate, Sulfate oder Glucuronide. Bei Senkung des Glutathionspiegels in der Leber, z.B. durch 2tägiges Hungern, erhöht sich die Toxizität von Aromaten wie Paracetamol und Brombenzol (Wendel et al. 1979, Casini et al. 1986). Aromaten ihrerseits (oder besser deren Metaboliten) senken den Glutathionspiegel in der Leber (Wendel et al.

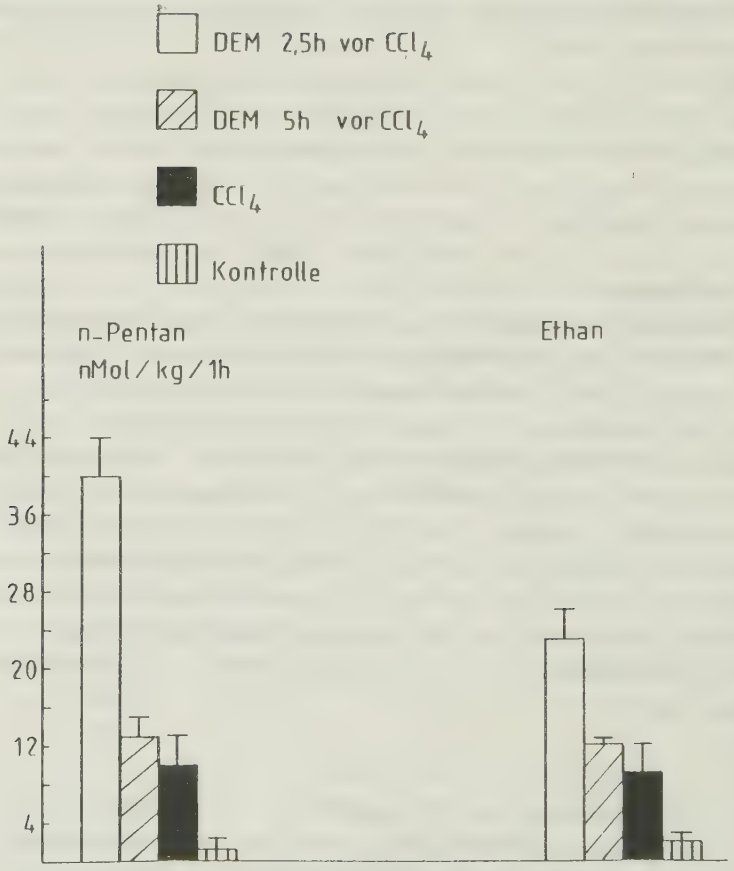

Abbildung 10: Einfluß von Diethylmaleat (0.6 ml/kg i.p.) auf die n-Pentan- und Ethanabatmung bei weiblichen SIV-Ratten nach der Behandlung mit Tetrachlormethan. Die Dosis CCl_4 betrug 0.4 ml/kg. (Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

1979). Die Natur der toxischen Metaboliten dieser Aromaten ist noch immer umstritten.

In den letzten 15 Jahren wurde Paracetamol (ein Analgetikum) auf seine toxische Wirkung hin untersucht. Es verursacht (in überdosis) bei Mensch und Tier zentrilobuläre Lebernekrose (Prescott et al. 1971, Mitchell et al. 1973). Die lebertoxische Wirkung des Paracetamols wird auf seine reaktiven Metaboliten zurückgeführt. Die Empfindlichkeit gegenüber der lebertoxischen Wirkung von Paracetamol ist speziesabhängig; zum Beispiel sind Hamster und Mäuse empfindlicher als Ratten. In vitro war die Bindung von Paracetamol (bzw. seiner Metaboliten) an Proteine bei Mäusen 15-fach höher als bei Ratten (Potter et al. 1973). Die kovalenten Bindungen an Leberproteine und die Toxizität von Paracetamol steigerten sich dramatisch, wenn die Mäuse zuvor mit 3-Methylcholanthren behandelt wurden, nicht aber bei Vorbehandlung mit Phenobarbital (Joannides et al. 1983, Mitchell et al. 1973). Dies spricht dafür, daß Cytochrom P-448 und nicht P-450 verantwortlich ist für die Aktivierung von Paracetamol.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Pessayre et al. (1980) bei Ratten: Die Induktion mit Phenobarbital zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Toxizität von Paracetamol. Dagegen führte eine Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren zur Erhöhung der Toxizität von Paracetamol, gemessen am Anstieg der Serum-Transaminasen, an den Lebernekrosen und der Bindung von Paracetamol (bzw. seiner Metaboliten) an die Leberproteine. Zusätzlich stellten die Autoren fest, daß Futterentzug während 42 Stunden die Toxizität von Paracetamol bei allen drei Versuchsgruppen erhöhte (Kontrollgruppe, phenobarbital-induzierte und 3-methylcholanthreninduzierte Ratten).

Den Einfluß des Fütterungszustandes auf die Toxizität von Paracetamol bei Mäusen hatten schon Wendel et al. (1979) untersucht. Sie fanden einen starken Anstieg der Abatmung von Ethan nach Gabe von 500 mg/kg Paracetamol, wenn die Mäuse 2 Tage lang kein Futter erhalten hatten. Durch den Futterentzug war bei Mäusen die Glutathion-Konzentration in der Leber um 40% erniedrigt.

Nach der Intoxikation von Mäusen mit hohen Dosen Paracetamol (500 mg/kg) wurde nicht nur eine starke Senkung des Glutathion-, sondern auch eine Senkung des Glykogen-Gehaltes der Leber festgestellt. Zwei Stunden nach der Intoxikation mit 500 mg/kg Paracetamol wurden nur noch 20% des gesamten Glykogen der Leber gefunden. Mäuse mit Futterentzug und Mäuse,

die eine Saccharose-Lösung (5% im Trinkwasser) erhielten, waren gleichermaßen betroffen von der Toxizität des Paracetamols (Hison et al. 1982).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der Einfluß von 50 Stunden Fasten bei Mäusen auf die Toxizität von CCl_4 und Paracetamol untersucht (Tab. 3). Hier wurden die Mäuse eine Stunde nach der Applikation (i.p.) von CCl_4 bzw. Paracetamol in den Exsikkator gesetzt und die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe für 3 Stunden gesammelt. Nach der Bestimmung der Kohlenwasserstoffe wurden die Mäuse getötet und die Serum-Transaminasen bestimmt. Ohne vorherige Gabe von Paracetamol oder CCl_4 lagen die Konzentrationen der Gase auch bei hungernden Mäusen immer sehr niedrig; Pentan war meist nicht nachweisbar. Hungernde Mäuse, die Paracetamol erhielten, zeigten einen signifikanten Unterschied zu nicht hungernden sowohl in der Erhöhung der Serum-Enzyme als auch in der Alkan-Abatmung. Bei CCl_4 hat jedoch das Hungern die Toxizität nicht beeinflußt. Da der wichtigste Effekt des Hungerns in der Senkung des Glutathionspiegels besteht, ist daraus zu folgern, daß die Toxizität von Paracetamol vom Glutathionspiegel abhängig ist: Ein Senken des Glutathionspiegels führt zu geringerer Entgiftung der Paracetamol-Metaboliten und daher zu einer erhöhten Toxizität. Die Toxizität von CCl_4 hingegen ist unabhängig vom Glutathionspiegel.

Weiter wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß des Hungerns (50 Stunden) und der Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren (ohne Hungern; 3 Tage 20 mg/kg, letzte Gabe 48 Stunden vor Paracetamol) auf die Kohlenwasserstoffabatmung bei Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich (Abb. 11 a,b), daß hungernde und 3-Methylcholanthren-vorbehandelte Mäuse fast die gleichen Mengen an Ethan und n-Pentan abatmeten, wenn sie eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion Paracetamol erhielten (400 mg/kg); auch der Anstieg von Ethan und n-Pentan im Laufe der Meßzeit (3 Stunden) verlief parallel, jedoch exhalierten Mäuse, die 50 Stunden gehungert hatten, mehr Ethylen als diejenigen, die mit 3-Methylcholanthren vorbehandelt waren.

Mäuse, die 50 Stunden lang eine Saccharoselösung (10% im Trinkwasser und kein Futter) erhielten, exhalierten viel weniger Ethan und n-Pentan als Mäuse, die 50 Stunden gehungert hatten. Beide Gruppen erhielten 500 mg/kg Paracetamol. Die mit Saccharose gefütterten Mäuse exhalierten ca. 77 nMol/kg Ethan in 4 Stunden und 10 nMol/kg n-Pentan in 4 Stunden; dagegen exhalierten die Mäuse, die 50 Stunden gehungert hatten, 680 nMol/kg Ethan (in 4 Stunden) und 85 nMol/kg n-Pentan (ebenfalls in 4 Stunden) (Abb. 12).

Tabelle 3: Einfluß von Futterentzug 50 Stunden auf die Kohlenwasserstoffentwicklung und Serumenzymkonzentration (GOT, GPT, LDH) nach der Intoxikation mit Paracetamol (500 mg/kg i.p.) oder Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.). Die Enzymbestimmung erfolgte sofort nach der Kohlenwasserstoffbestimmung. Alle Mäuse erhielten Wasser ad lib. bis zur Toxin-Gabe. (Mittelwerte und Standardabweichung)

Behandl. kg^{-1} ip	Ernährungs- zustand	nMol/kg/3h					Serum			n
		Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	GOT	GPT	LDH	
keine	gefüttert	10±3	9±3	2±1	2±1	-	96±16	50±8	1358±287	4
keine	gehungert	10±3	8±3	3±2	-	-	130±27	45±6	2252±503	4
Parac. 500 mg	gefüttert	18±4	11±4	4±2	4±2	5±2	567±409	457±380	2340±854	4
Parac. 500 mg	gehungert	150±12	30±5	11±3	17±4	40±7	1687±1197	1422±992	8200±5790	4
CCl_4 0.4 ml	gefüttert	19±4	8±3	6±2	6±2	22±5	820±453	355±228	5025±584	4
CCl_4 0.4 ml	gehungert	38±6	8±3	8±3	4±2	31±5	797±231	460±171	5370±1385	4

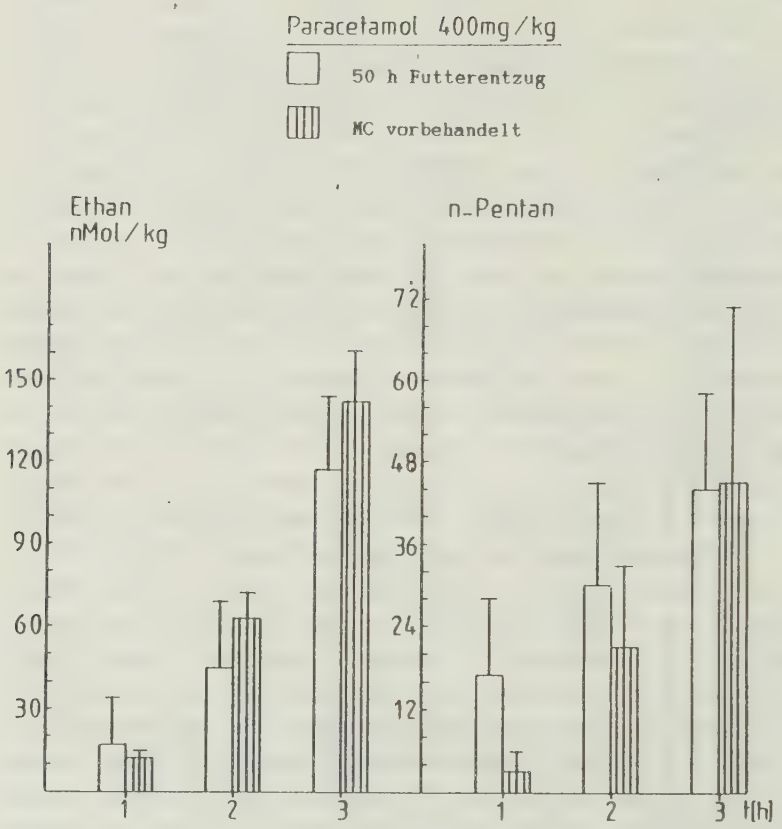

Abbildung 11 a: Der Einfluß von hungern oder 3-Methylcholanthren auf die Kohlenwasserstoffabatmung nach der Behandlung mit Paracetamol bei weiblichen NMRI-Mäusen. Die mit 3-Methylcholanthren vorbehandelten Tiere bekamen Futter und Wasser bis eine Stunde vor Beginn der Gasmessung; gehungerte Mäuse erhielten 50 Stunden lang kein Futter, aber Wasser nach belieben. (Mittelwert und Standardabweichung)

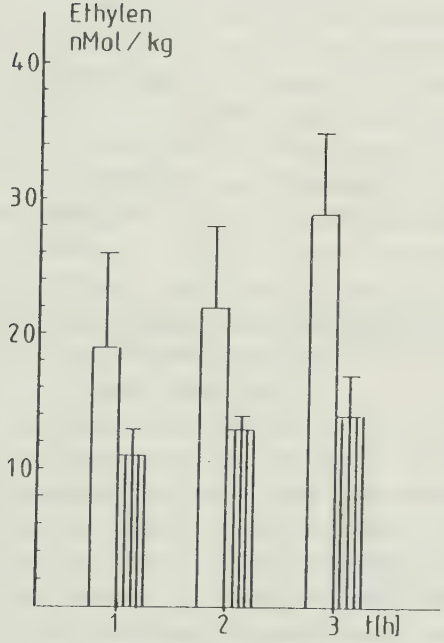

Abbildung 11 b: siehe Abb. 11 a

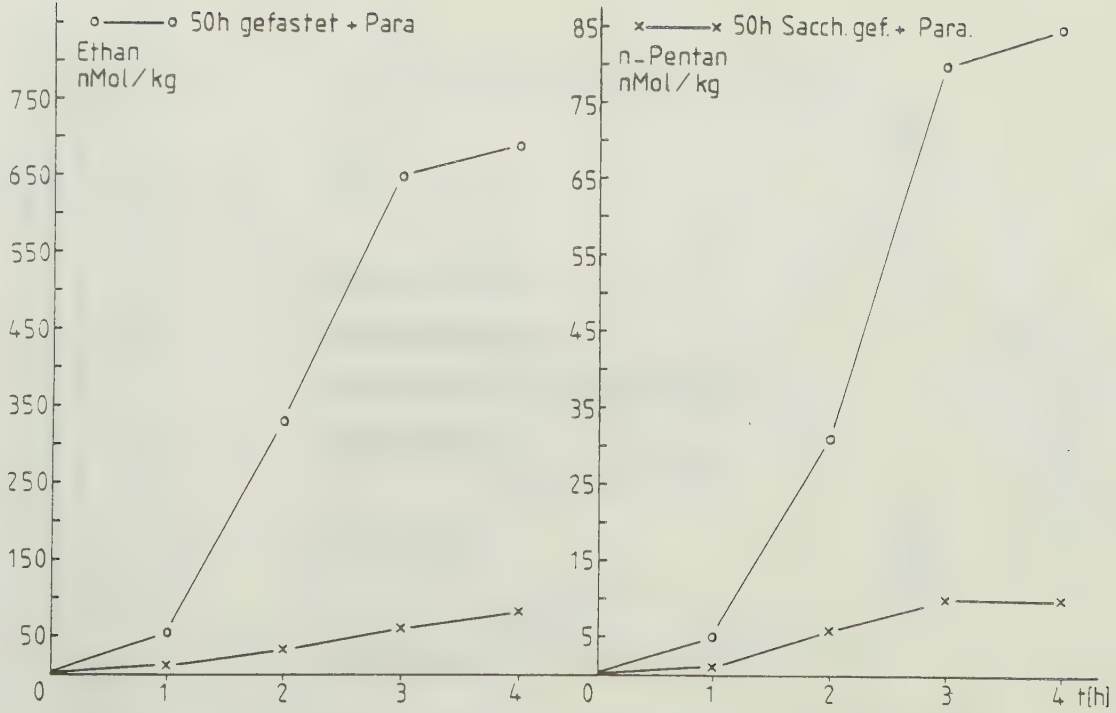

Abbildung 12: Einfluß von Hungern (50 Stunden) oder Saccharose-Fütterung (50 Stunden und ohne Festfutter) auf die Ethan- und n-Pentan-Abatmung nach der Intoxikation mit Paracetamol (500 mg/kg i.p. eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion) bei weiblichen NMRI-Mäusen.

In einem weiteren Versuch (Abb. 13 a,b) erhielten Mäuse die gleiche Methylcholanthren-Vorbehandlung, aber Paracetamol wurde erst sechs Tage nach der letzten Injektion gegeben. Die starke Abatmung von Ethan und Pentan begann erst drei Stunden nach der Paracetamol-Gabe. Von den zwei Mäusen dieser Gruppe starb eine innerhalb von 24 Stunden.

Die Resultate bestätigen damit die Giftungsfunktion von Cytochrom P-448 für Paracetamol bei Mäusen (s. Ioannides et al. 1983, 1984).

Die Zerstörung von Cytochrom P-450 durch CCl_4 wurde von Reiner et al. (1972) berichtet. Das in Abb. 14 a,b gezeigte Ergebnis deutet darauf hin, daß auch Cytochrom P-448 durch CCl_4 zerstört und blockiert wird, wodurch die Metabolisierung von Paracetamol zu seinen aktiven Metaboliten gehemmt wird. Vorbehandelte Mäuse, die vorher 50 Stunden gehungert haben (Vorbehandlung mit CCl_4 4 Stunden vor Paracetamol-Gabe), exhalierten viel weniger Ethan, Ethylen und n-Pentan als diejenigen, die nur Paracetamol erhielten. Umgekehrt ergibt sich aus Abb. 15, daß Paracetamol, vor CCl_4 gegeben, die Wirkung in bezug auf die Kohlenwasserstoffabatmung überadditiv verstärkt. Dies läßt sich wahrscheinlich damit erklären, daß die Giftung von Paracetamol größtenteils schon innerhalb der ersten Stunde stattfindet, während die Leberschädigung wie bei Intoxikationen des Menschen ein langsam ablaufender Prozeß ist.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, daß der Hungerzustand die Aktivität des Fremdstoffmetabolismus verändern kann. Die Metabolisierung von Hexobarbital, Aminopyrin und Anilin durch Lebermikrosomen, die von hungernden Ratten stammten (Dauer des Futterentzuges 72 Stunden), war erhöht (Kato 1967). Kato und Gillette (1965) untersuchten den Einfluß von Nahrungsentzug auf die Aktivität der lebermikrosomalen NADPH-abhängigen Enzyme bei weiblichen und männlichen Ratten. Sie fanden, daß die Aktivität der Oxidation bzw. der Reduktion von verschiedenen Substraten durch Mikrosomen weiblicher Ratten in unterschiedlichem Maße erhöht wird, z.B. die Oxidation von Aminopyrin um 114% und die von Anilin um 94%.

Verschiedene Autoren (Harris und Anders 1980, Suarez et al. 1981, Stubelt et al. 1981) fanden, daß Hungern (24 Stunden) die Toxizität von CCl_4 bei Ratten und Mäusen - gemessen an den erhöhten Serum-Transaminasen - erhöht. Die Serum-Transaminasen wurden bei diesen Versuchen 24 Stunden nach der CCl_4-Gabe bestimmt.

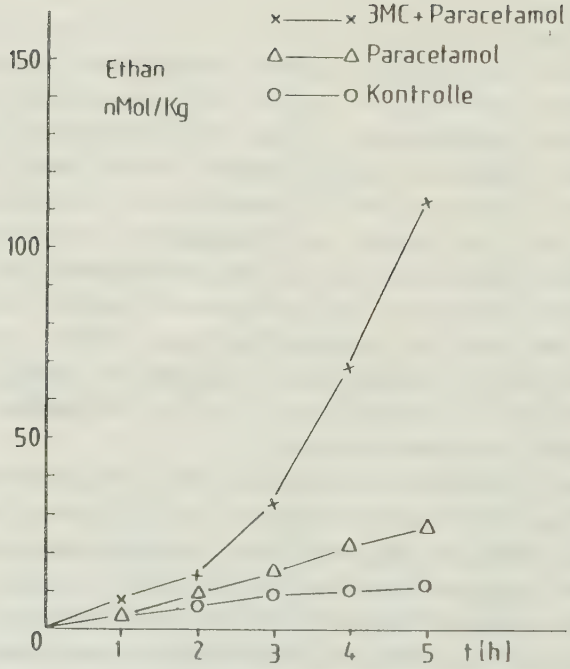

Abbildung 13 a: Exhalation von Kohlenwasserstoffen bei weiblichen NMRI-Mäusen. Mit 3-Methylcholanthren behandelte Tiere bekamen 3 × 20 mg/kg 3-MC in 3 Tagen, wobei die letzte 3-MC-Gabe sechs Tage vor der Behandlung mit Paracetamol (0.5 g/kg i.p.) erfolgte. Aller Mäuse erhielten Futter und Wasser bis eine Stunde vor der Paracetamolbehandlung.

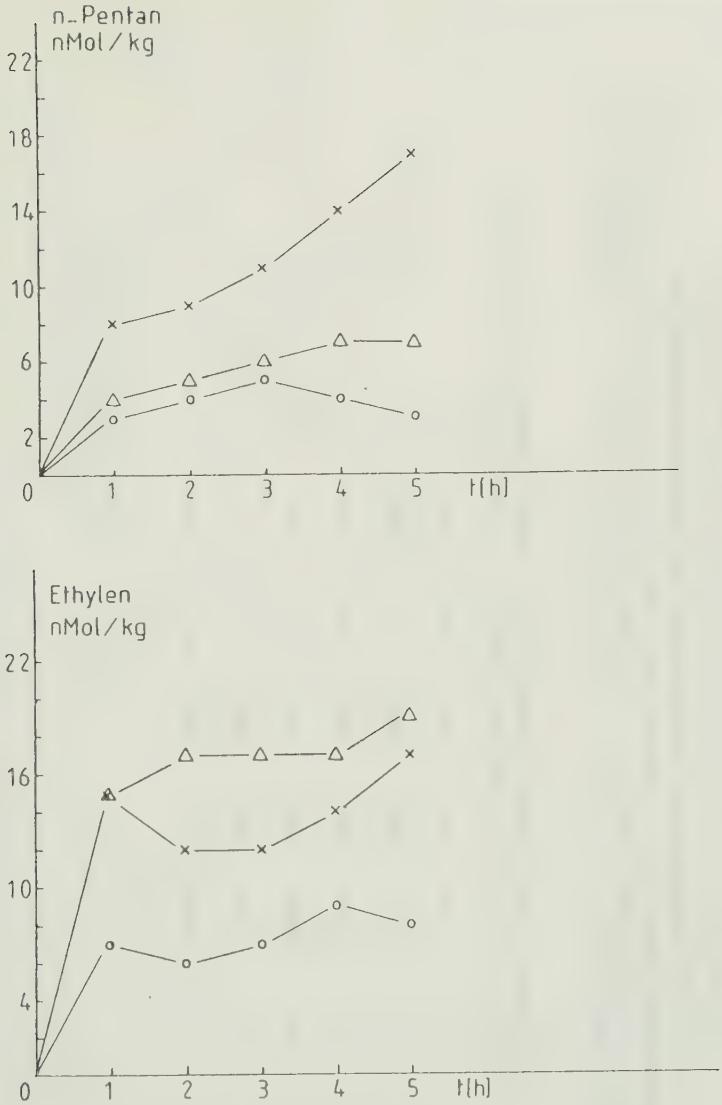

Abbildung 13 b: siehe Abb. 13 a

Tabelle 4: Einfluß der Induktion mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) oder 3-Methylcholanthren (20 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) auf die Kohlenwasserstoffexhalation bei gefütterten weiblichen NMRI-Mäusen nach der Behandlung mit Paracetamol. (Mittelwerte und Standardabweichung)

	Paracetamol mg/kg	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	Mortalität in 10h	Mortalität in 48h	n
		nMol/kg in 4-5h							
Kontrolle	-	11±2	8±2	3±1	3±3	3±3	0/4	0/4	4
Phenobarb.	-	11±2	15±3	2±2	-	4±2	0/2	0/2	2
3-Methylc.	-	7±3	12±5	6±4	2±2	3±3	0/4	0/4	4
Kontrolle	400	18±4	12±4	4±2	5±2	4±2	0/4	0/4	4
Phenobarb.	400	12±2	19±4	2±2	-	-	0/2	0/2	2
3-Methylc.	400	224±54	17±6	6±2	6±2	43±2	4/4	-	4

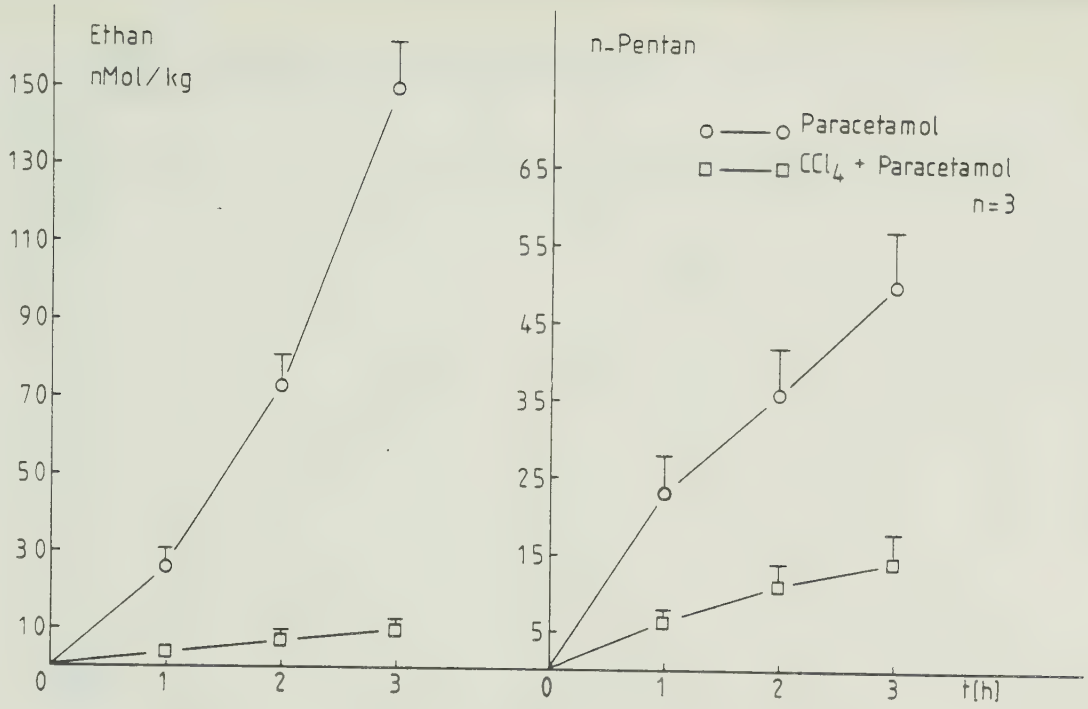

Abbildung 14 a: Hemmung der Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch Vorbehandlung mit Tetrachlormethan (0.4 ml/kg) 4 Stunden vor Paracetamolbehandlung und 50 Stunden Futterentzug bei weiblichen NMRI-Mäusen. Die Dosis Paracetamol betrug 500 mg/kg. (Mittelwert und Standardabweichung)

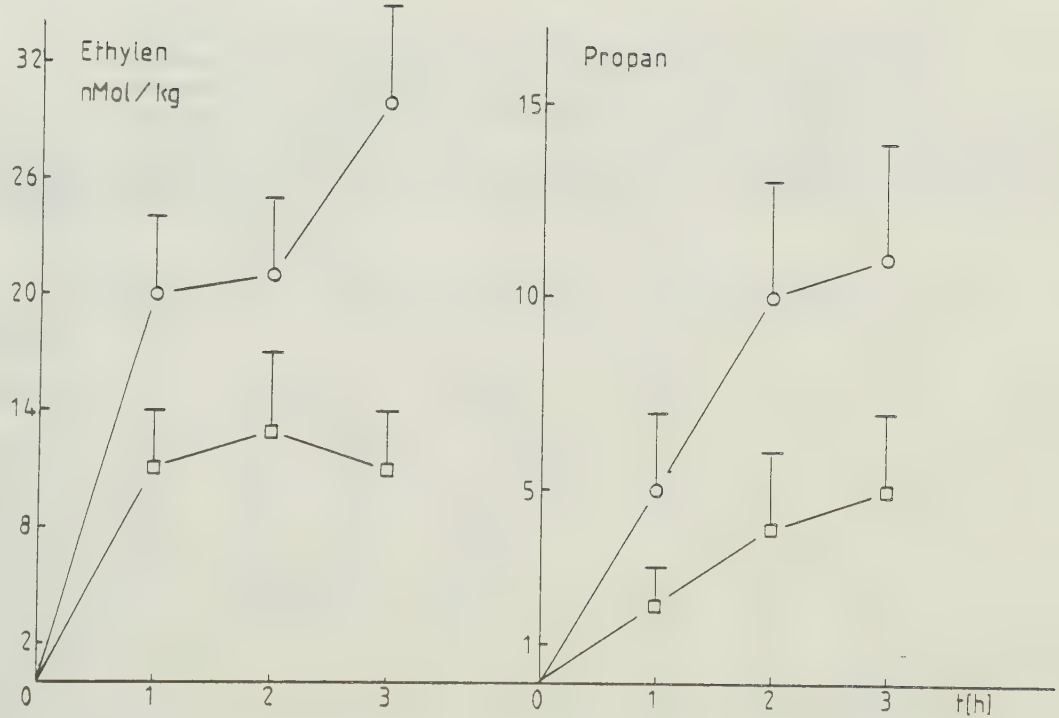

Abbildung 14 b: siehe Abb. 14 a

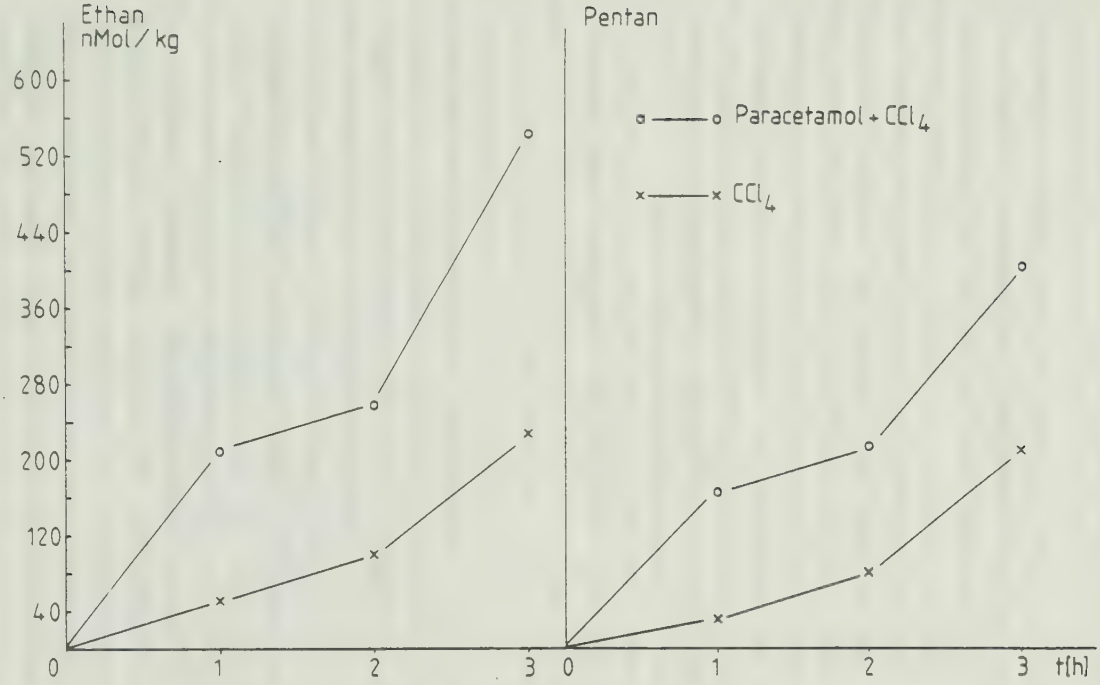

Abbildung 15: Einfluß von Paracetamolvorbehandlung (500 mg/kg) 1 Stunde vor Tetrachlormethan-Gabe (0.4 ml/kg i.p. 1 Stunde vor Beginn der Gaskollektion) auf die Kohlenwasserstoffexhalation bei weiblichen NMRI-Mäusen mit 50 Stunden Futterentzug.

Bei den jetzigen Versuchen wurden die Serum-Transaminasen 4 Stunden nach der Behandlung mit CCl_4 bzw. Paracetamol bestimmt. Das Hungern hatte hier keinen Einfluß auf die Toxizität von CCl_4, während ein deutlicher Einfluß des Hungerns auf die Toxizität von Paracetamol festzustellen war (Tab. 3).

Aus den Ergebnissen der Versuche ist zu schließen, daß - in Übereinstimmung mit der Literatur - die Giftung von Paracetamol gesteigert wird nach Vermehrung von Cytochrom P-448. Diese wird erreicht durch Vorbehandlung der Tiere mit Methylcholanthren; ferner könnte Nahrungsentzug auch in dieser Weise wirken und somit noch durch einen anderen Mechanismus als durch Senkung von Glutathion die Toxizität von Paracetamol erhöhen. Umgekehrt vermindert die Zerstörung von Cytochrom P-448 durch CCl_4 die Abatmung der Kohlenwasserstoffe, die hier als Indikator der toxischen Wirkung diente. Die Schutzeffekte der Fütterung von Saccharose gegenüber der Wirkung des Nahrungsentzugs ist in ihrem Mechanismus nicht geklärt: Es könnte entweder sein, daß die Senkung des Glutathion verhindert wird oder daß es nicht zur Vermehrung von Cytochrom P-448 kommt.

III.1.4 Einfluß von L-Methionin, L-Cystein und Acetylsalicylsäure

Die in III.1.3 benannte höhere Toxizität von Paracetamol bei Absenkung des Glutathionspiegels führt im Umkehrschluß zu der Vermutung, daß eine Erhöhung des Glutathionspiegels bei Versuchstieren die Toxizität von Paracetamol zu vermindern vermag. In der Tat konnten Wendel et al. (1982) zeigen, daß die Vorbehandlung von Mäusen mit Glutathion - in freier Form oder besser in Liposomen eingeschlossen - wirksam ist gegen die lebertoxische Wirkung von Paracetamol (bzw. seiner Metaboliten). Zum gleichen Ergebnis führte eine Vorbehandlung mit Cystein, also einer der Vorstufen des Glutathions (Mitchell et al. 1973a). Entsprechende Ergebnisse erzielte Prescott (1983) mit anderen Schwefelverbindungen: Cysteamin, Methionin und N-Acetylcystein schützten die Leber und Nieren vor der toxischen Wirkung von Paracetamol bei Menschen, vor allem wenn diese Substanzen innerhalb der ersten 8 bis 10 Stunden nach der Intoxikation mit Paracetamol gegeben wurden. Whitehouse et al. (1976) fanden, daß die Vorbehandlung von Mäusen mit Acetylsalicylsäure (Aspirin) die hepatotoxische Wirkung von Paraceta-

mol verringert.

Bei den jetzigen Versuchen zeigte sich, daß L-Methionin, L-Cystein und auch Acetylsalicylsäure die Kohlenwasserstoffabatmung von Mäusen hemmen und die Toxizität des Paracetamols verringern. Mäuse, die vorher 50 Stunden gehungert hatten, erhielten 1.0 g/kg L-Methionin, 1.0 g/kg L-Cystein oder 500 mg/kg Acetylsalicylsäure eine Stunde vor der Paracetamolgabe i.p. injiziert. Eine Stunde nach der Paracetamolgabe wurden sie in den Exsikkator gebracht und die Kohlenwasserstoffe gaschromatographisch bestimmt (Abb. 16 a,b und 17).

Die Mortalität von Mäusen, die nur Paracetamol erhielten, betrug 100% innerhalb von 6 Stunden. Mäuse, die mit L-Methionin oder L-Cystein vorbehandelt waren, überlebten die 24 Stunden nach der Toxin-Gabe. Bei mit Acetylsalicylsäure vorbehandelten Mäusen betrug die Mortalität in 24 Stunden 50%.

Die Vorbehandlung von hungernden Mäusen mit L-Methionin oder L-Cystein eine Stunde vor der Paracetamolgabe (500 mg/kg i.p.) hemmte die Abatmung von Ethan und n-Pentan, die normalerweise nach der Behandlung mit Paracetamol auftreten würde. Beispielsweise ging die Ethan-Exhalation von 180 nMol/kg in 3 Stunden auf 20 nMol/kg in 3 Stunden zurück. Die n-Pentan-Abatmung erreichte nach alleiniger Paracetamol-Behandlung 50 nMol/kg in 3 Stunden; die Vorbehandlung mit L-Methionin oder L-Cystein drückte diese auf 2 nMol/kg in 3 Stunden.

Differenzierter war der Einfluß der Vorbehandlung mit L-Methionin oder L-Cystein auf die Ethylenabatmung. L-Methionin-vorbehandelte Mäuse exhalierten fast die gleiche Menge an Ethylen wie diejenigen, die nur Paracetamol erhalten hatten. Anders war die Wirkung von L-Cystein-Vorbehandlung: Diese Mäuse exhalierten weniger Ethylen als solche, die mit L-Methionin vorbehandelt waren oder die nur Paracetamol erhalten hatten (Abb. 16 b).

Die Schutzwirkung von Acetylsalicylsäure gegenüber dem hepatotoxischen Effekt von Paracetamol zeigte sich auch im hier benutzten Modell: Ethan und Pentan wurden in erheblich reduzierten Mengen abgeatmet (Abb. 15).

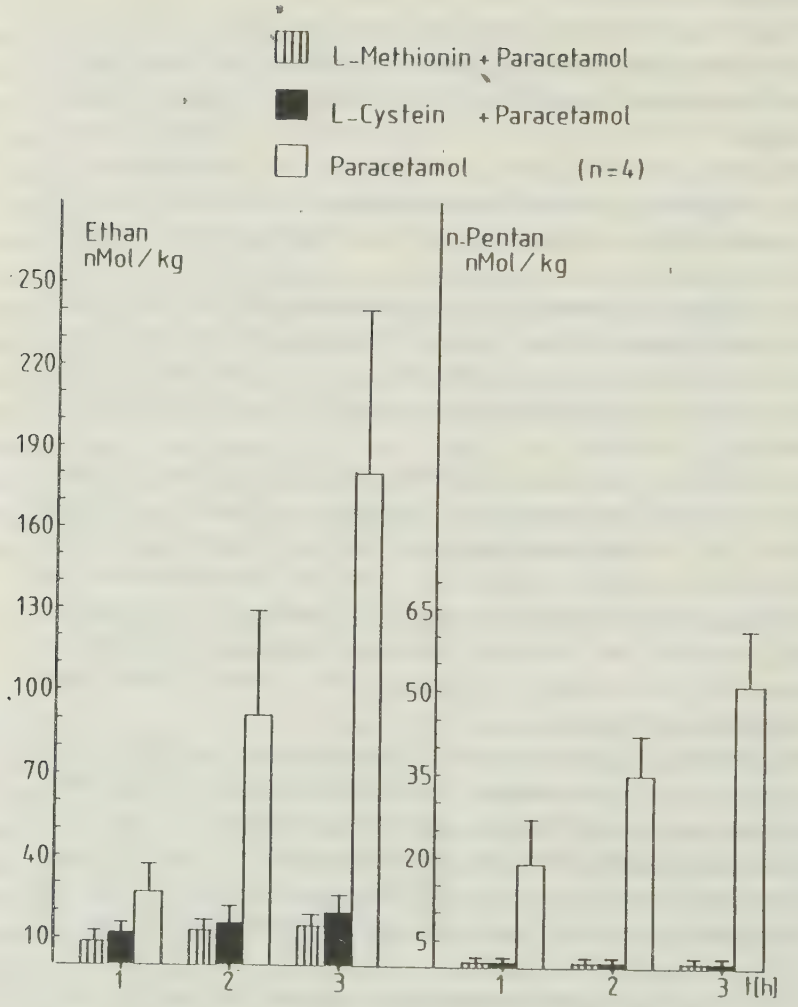

Abbildung 16 a: Hemmung der Kohlenwasserstoffabatmung durch L-Methionin, L-Cystein und Aspirin (L-Methionin oder L-Cystein 1 g/kg i.p., Aspirin 500 mg/kg i.p.) eine Stunde vor Paracetamol-Behandlung (500 mg/kg i.p.) bei 50 Stunden gehungerten weiblichen NMRI-Mäusen. (Mittelwert und Standardabweichung)

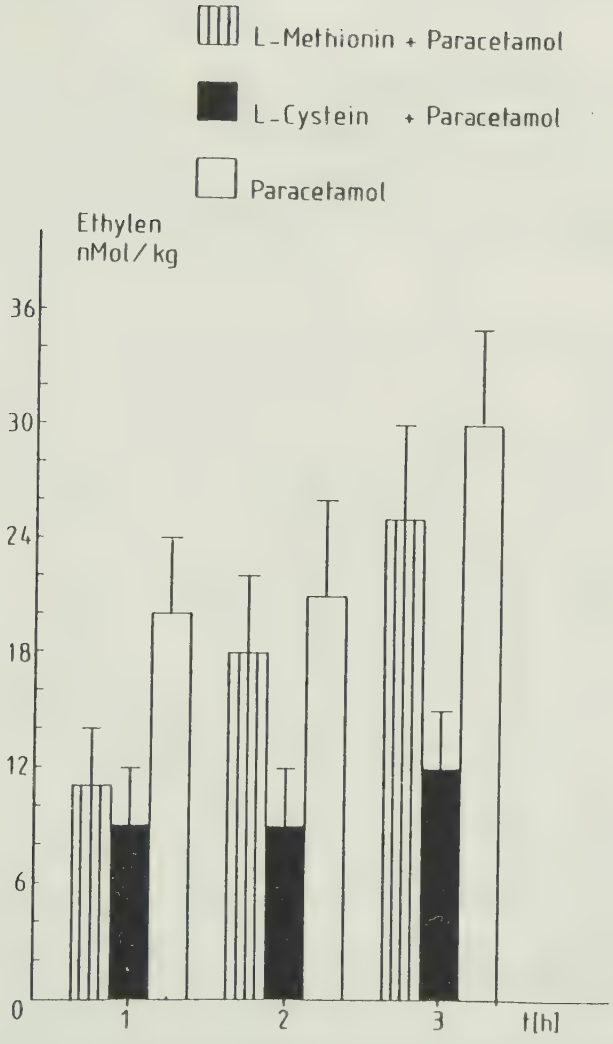

Abbildung 16 b: siehe Abb. 16 a

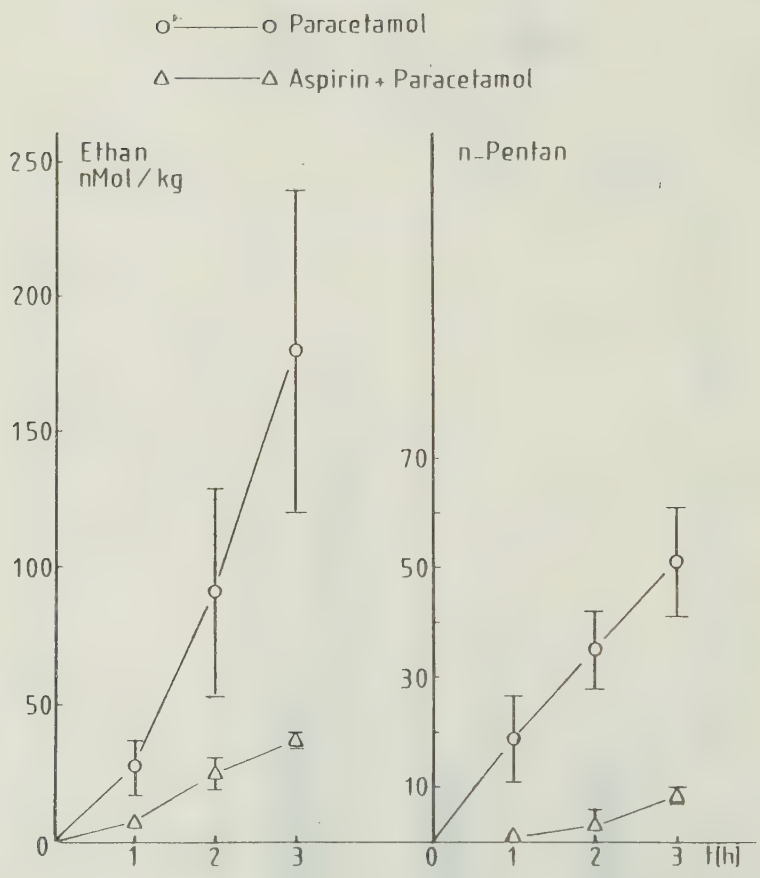

Abbildung 17: Der Einfluß von Aspirinvorbehandlung (500 mg/kg i.p.) auf die Ethan- und n-Pentanabatmung weiblicher NMRI-Mäuse (50 Stunden Futterentzug) nach der Intoxikation mit Paracetamol (Paracetamol 500 mg/kg i.p. eine Stunde nach Aspirin-Gabe). (Mittelwert und Standardabweichung, n=2-4)

III.1.5 Einfluß von Paracetamol auf die Kohlenwasserstoffbildung in vitro

Die in vivo gefundenen Effekte verschiedener Vorbehandlungen auf die Kohlenwasserstoff-Abatmung nach Paracetamolgabe lassen sich in vitro nicht nachvollziehen, denn bereits bei Inkubation von Mäuselebermikrosomen mit Paracetamol und NADPH-regenerierendem System zeigt sich das Gegenteil dessen, was in vivo beobachtet wurde: Paracetamol hemmte in vitro die Entwicklung von Kohlenwasserstoffen (Tab. 5).

Tabelle 5:

Hemmung der Lipidperoxidation durch Paracetamol in Lebermikrosomen von weiblichen NMRI-Mäusen; die Lipidperoxidation wurde durch NADPH ausgelöst.

	pMol/mg Protein/2 Stunden						
	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	i-Buten	n
Mikrosomen + 2 mmol/l Paracetamol	-	-	-	-	-	-	3
Mikrosomen	556±140	16±1	6±1	15±2	217±19	-	3

III.2 DER EINFLUSS VON PARACETAMOL, TETRACHLORMETHAN UND BROMBENZOL AUF DIE METABOLISIERUNG VON PENTAN UND ISOBUTEN

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, resultieren die in der Gasphase gemessenen Konzentrationen der Kohlenwasserstoffe aus der Bilanz von Bildung und oxidativem Abbau. Es war aufgefallen, daß das Verhältnis von n-Pentan zu Ethan nach der Intoxikation mit CCl_4 bei ca. 1:1 liegt (Abb.

10); nach der Intoxikation mit Paracetamol wurde jedoch ein Verhältnis von ca. 0.4:1 beobachtet. Dies könnte darauf zurückgehen, daß die beiden Toxine den Abbau in unterschiedlichem Maße hemmen. In Abb. 18 wird der Abbau von n-Pentan durch Mäuse, die eine Stunde vorher mit CCl_4 bzw. Paracetamol behandelt worden waren, dargestellt. Die Mäuse, die Paracetamol erhielten, hungerten 50 Stunden vor der Paracetamol-Gabe. Die Mäuse, die CCl_4 erhielten, wurden nur über Nacht nüchtern gesetzt. Die Dosis Paracetamol betrug 500 mg/kg, die Dosis CCl_4 0.4 ml/kg. Die Elimination war nach CCl_4 sehr stark gehemmt, nach Paracetamol deutlich weniger, was mit den Unterschieden in den Pentan/Ethan-Verhältnissen in Einklang steht.

Die Tab. 6 zeigt den Abbau von n-Pentan und Isobuten nach der Intoxikation mit Paracetamol, CCl_4 und Brombenzol. Bei beiden Gasen sieht man eine dosisabhängige Verzögerung der Elimination aus dem Exsikkatorsystem durch Paracetamol und CCl_4; auch Brombenzol hat in einer hohen Dosis diese Wirkung.

Daß die CCl_4-Wirkung reversibel ist, geht aus Tab. 7 hervor. Ab 24 Stunden nach der Gabe steigt die Isobuten-Clearance an, um nach 96 Stunden wieder den Normalwert zu erreichen (Remmer und Ghareibeh 1984). Ähnliche Zeitverläufe ergeben sich aus der Literatur bei Benutzung von anderen Parametern. 72 Stunden nach der Intoxikation mit CCl_4 (1.5 ml/kg) sind die Serum-Transaminasen zum Normalwert zurückgekehrt, und nach 48 Stunden wurde kein CCl_4 in der Leber mehr gefunden (Teschke et al. 1984). Diese Leberregeneration nach der Intoxikation mit CCl_4 wurde von Nakata et al. (1985) bestätigt.

III.3 DER EINFLUSS VON AKUTEM ETHANOL

III.3.1 Abatmung von Isobuten nach der Intoxikation mit Ethanol

Nach der Behandlung von Labortieren mit Ethanol (akut) atmeten diese Tiere eine relativ große Menge an Isobuten aus, wobei Mäuse erheblich mehr Isobuten ausatmeten als Ratten (Hintze 1981).

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, woher dieses Gas stammt. Da Isobuten ein verzweigter Kohlenwasserstoff ist, kann es nicht aus den

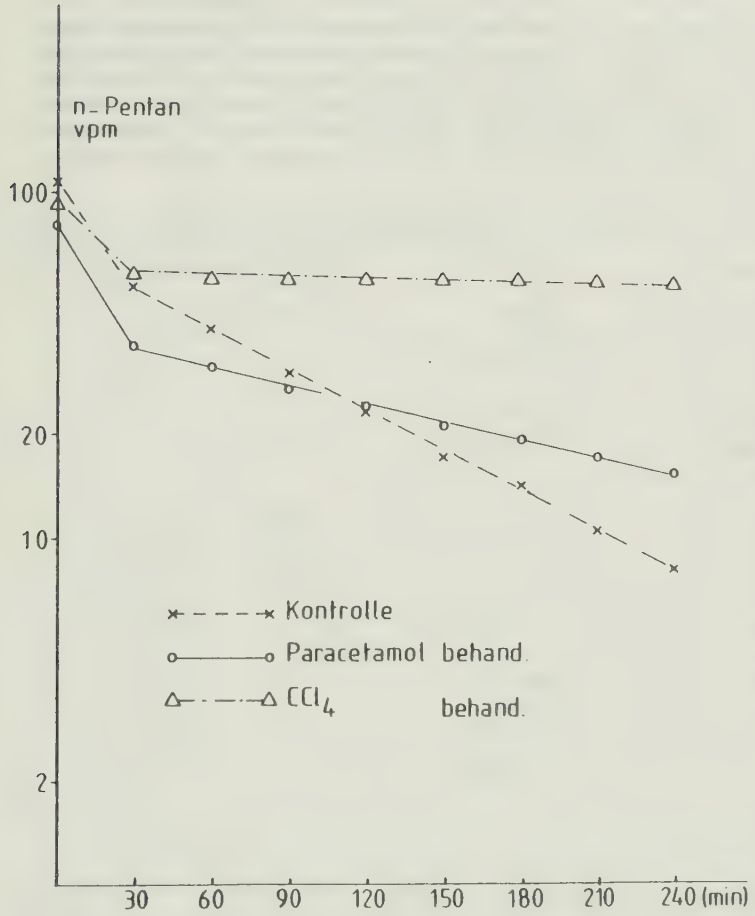

Abbildung 18: Elimination von n-Pentan durch weiblliche NMRI-Mäuse in einem geschlossenen Expositionssystem nach der Behandlung mit Paracetamol (500 mg/kg i.p.) oder Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.). Mäuse, die Paracetamol erhielten, hungerten 50 Stunden vorher. Mit Tetrachlormethan behandelte wurden über Nacht nüchtern gesetzt, erhielten aber Wasser nach Belieben. Die Kontrollmäuse wurden über Nacht nüchtern gesetzt.

Tabelle 6: n-Pentan- und Isobuten-clearance bei weiblichen NMRI-Mäusen nach der Behandlung mit lebertoxischen Stoffen. Mit Paracetamol behandelte Mäuse hungerten 50 Stunden vor der Paracetamol-Gabe; Tetrachlormethan- oder Brombenzol-behandelten Mäusen wurde vor der Toxingabe über Nacht das Futter entzogen. Aller Mäuse erhielten Wasser nach Belieben. Tetrachlormethan und Paracetamol wurden eine Stunde vor dem Versuch injiziert; Brombenzol wurde 3 Stunden vor dem Versuch injiziert (i.p.).

	Clearance (l/kg×h)		
Behandlung	n-Pentan	Isobuten	n
Kontrolle	16±2.2	16.8±2.0	4
Paracetamol 500 mg/kg	6.7±0.3	5.5±0.3	4
Paracetamol 300 mg/kg	9.04	-	1
CCl_4 0.4 ml/kg	1.3±1.3	1.0±0.6	4
CCl_4 0.1 ml/kg	3.53	-	1
Brombenzol 1 ml/kg	3.55±0.24	-	2

Tabelle 7: Isobuten-clearance nach einmaliger Behandlung mit Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.) bei (über Nacht) nüchtern gesetzten weiblichen NMRI-Mäusen.

Zeit (h)	Isobuten-Clearance (l/kg×h)
1	1.0±0.6
6	0
12	1.3
24	4.2
48	6.8
72	13.7
96	19.5
Kontrolle	16.8±2.0

Fettsäuren stammen, sondern muß aus verzweigten Aminosäuren kommen.

Patienten mit chronischer Lebererkrankung haben einen höheren Plasmaspiegel an aromatischen Aminosäuren statt verzweigter Aminosäuren. Diese Änderungen sind auf Proteinabbau zurückzuführen (Sherlock 1984).

Gefütterte NMRI-Mäuse erhielten 2 g/kg Ethanol i.p. und 30 Minuten danach L-Leucin (1 g/kg ebenfalls i.p.). Danach wurden sie in die Exsikkatoren gebracht und 3 Minuten lang mit synthetischer Luft begast. Nach dem Verschließen der Exsikkatoren wurde das Isobuten der Atemluft gesammelt und zu verschiedenen Zeiten bestimmt.

Die Behandlung der Mäuse mit Ethanol allein (akut) führte zu einer vermehrten Isobutenabatmung, die nach 3 Stunden im Exsikkator mehr als 30 nMol/kg betrug. Noch deutlicher war jedoch die Isobutenabatmung bei zusätzlich mit L-Leucin behandelten Mäusen, die nach 3 Stunden mehr als 90 nMol/kg Isobuten abatmeten (Abb. 19). Unbehandelte oder nur mit L-Leucin behandelte Mäuse atmeten kein Isobuten ab.

Hintze (1981) nahm an, daß Isobuten endogen entsteht und durch Ethanol verstärkt abgeatmet wird. Deshalb wurde unter Alkoholwirkung mit und ohne Leucin der Anstieg und Abfall der Isobuten-Konzentration im Exsikkator verfolgt. Nach 3 Stunden Exsikkatoraufenthalt von Mäusen, die Ethanol und L-Leucin erhalten hatten, war die höchste Menge an Isobuten vorhanden; sie entsprach 84 nMol/kg. Danach wurde das Isobuten langsam abgebaut und fiel nach 6 Stunden auf 39 nMol/kg ab (Abb. 20).

Die Deutung dieses Effektes ist unsicher: Insbesondere steht bisher nicht fest, ob Ethanol die β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (die für die Carboxylierung von Leucin verantwortlich ist) hemmt.

In-vitro-Experimente zeigten in diesem Fall deutlich abweichende Ergebnisse, denn es kam zu Isobutenentwicklung, wenn Leucin mit Leberhomogenat inkubiert wurde (Abb. 21). Nach 2 Stunden Inkubationszeit von 1 mmol/l L-Leucin mit dem Leberhomogenat wurden etwa 50 pmol/mg Protein Isobuten gefunden. Dies ließ sich durch Zugabe von NAD (1 mmol/l) auf fast das Doppelte steigern. Die Zugabe von Ethanol hatte den gegenteiligen Effekt wie im in-vivo-Experiment: Ethanol hemmte nämlich hier die Isobutenentwicklung.

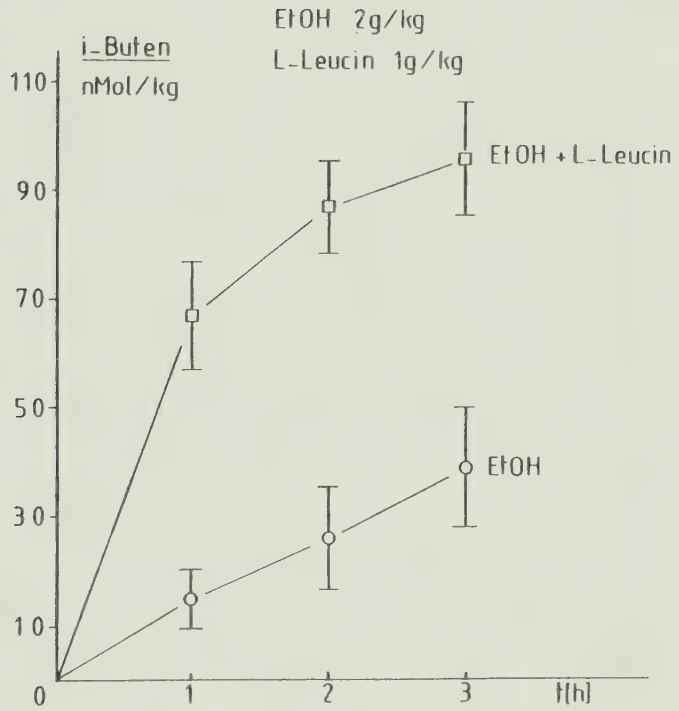

Abbildung 19: Abatmung von i-Buten bei weiblichen NMRI-Mäusen nach der Behandlung mit Ethanol (2 g/kg i.p.) oder Ethanol und L-Leucin (1 g/kg i.p.). Das L-Leucin wurde 30 Minuten nach der Ethanol-Gabe verabreicht. (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

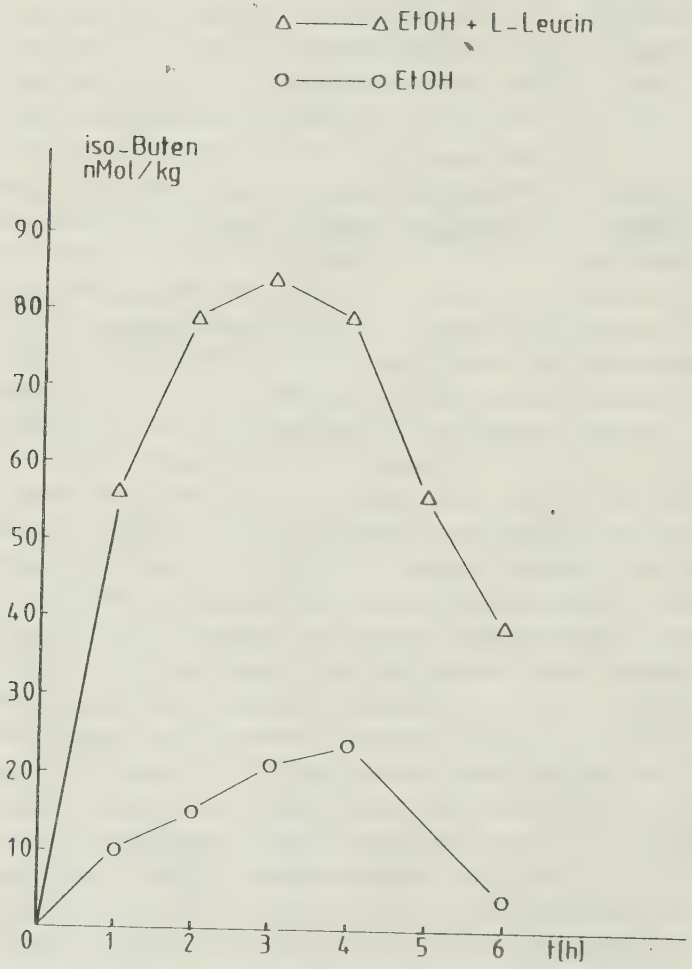

Abbildung 20: Einfluß von Ethanol (akut 2 g/kg i.p.) und Ethanol und L-Leucin (L-Leucin 1 g/kg i.p., 30 Minuten nach der Ethanol-Gabe) auf die Isobuten-Abatmung bei gefütterten weiblichen NMRI-Mäusen. Die Kontroll-Mäuse und allein mit L-Leucin behandelte Mäuse exhalierten kein Isobuten.

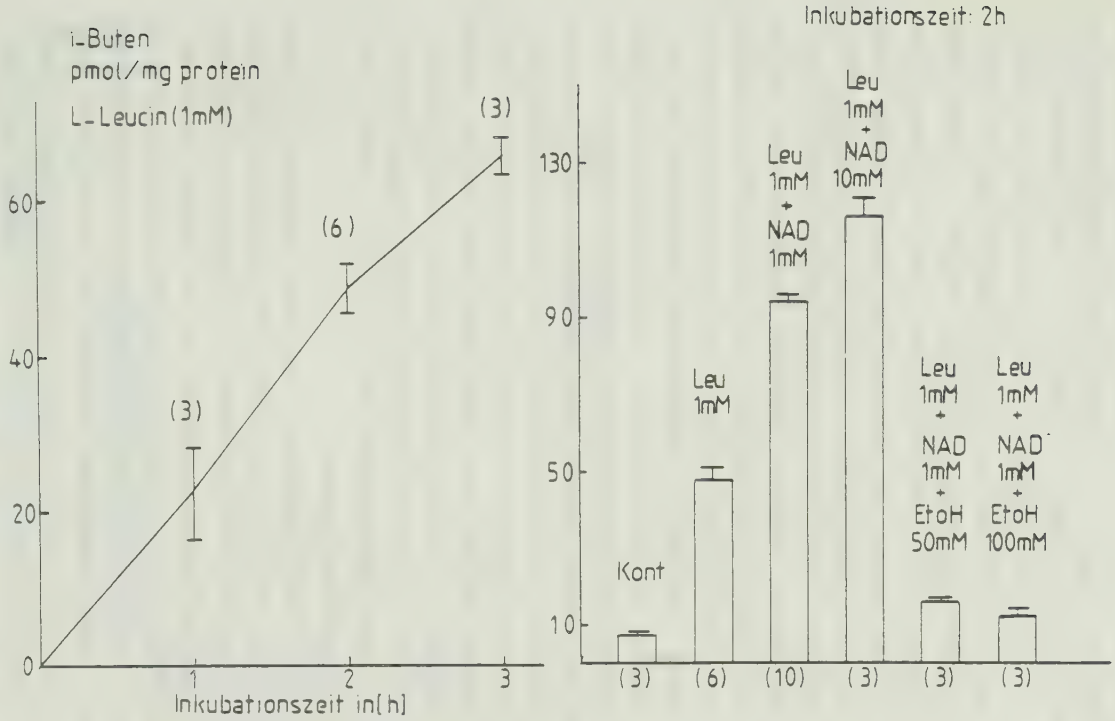

Abbildung 21: In-vitro-Bestimmung von Isobuten nach der Inkubation von L-Leucin mit Leberhomogenat (aus Lebern von NMRI-Mäusen, überstand nach der Zentrifugation bei 10 000 x g 10 Minuten lang); als Puffer diente eine Tris-KCl-Lösung (pH 7.5).

III.3.2 Ethanol und CCl_4

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, potenziert Ethanol die hepatotoxische Wirkung von CCl_4 (Cornish und Adefuin 1966, 1967; Klaassen und Plaa 1967, Traiger und Plaa 1972, Maling et al. 1975, Strubelt et al. 1974, 1978). Die potenzierende Wirkung war am stärksten, wenn das Ethanol 18 Stunden vor der CCl_4-Behandlung verabreicht wurde, während eine Vorbehandlung der Ratten mit Ethanol 2 Stunden vor der CCl_4-Gabe ohne Auswirkungen blieb (Cornish und Adefuin 1966). Eine Vorbehandlung der Ratten mit Ethanol (5 ml/kg) 18 Stunden vor der CCl_4-Gabe zeigte keine Auswirkung auf die Lipidperoxidation gemessen an der Ethanexhalation (Lindstrom und Anders 1978). Dieses Experiment von Lindstrom und Anders unterliegt jedoch einem wichtigen Kritikpunkt: Die lange Dauer von 18 Stunden zwischen Ethanol- und CCl_4-Gabe und die hohe Ethanolabbaurate gerade bei Ratten führt zu der überlegung, daß nicht das Ethanol selbst, sondern allenfalls Restmengen an Abbauprodukten zum Zeitpunkt der CCl_4-Gabe als Wirkungspartner vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Ethan- und n-Pentan-Abatmung gemessen, die sich bei einer Zeitdifferenz von 5 Stunde zwischen beiden Behandlungen ergibt. Zusätzlich wurden auch die Serum-Transaminasen bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abb. 22.

Weibliche SIV-Ratten wurden über Nacht nüchtern gesetzt. 5 Stunden vor CCl_4-Gabe erhielten sie eine Dosis Ethanol von 4 g/kg i.p.; eine Stunde nach der CCl_4-Gabe (0.4 ml/kg) wurden die Ratten in den Exsikkator gebracht, und nach einer Stunde Gaskollektion wurden die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe gaschromatographisch bestimmt, danach die Ratten getötet und die Serum-Transaminasen gemessen.

Ratten, die mit Ethanol vorbehandelt worden waren, exhalierten in einer Stunde 16±4 nMol/kg Ethan und 19±4 nMol/kg n-Pentan. Dagegen exhalierten die Ratten, die nur CCl_4 erhalten hatten, 9±3 nMol/kg Ethan und 10±3 nMol/kg n-Pentan. Die Serum-Transaminasen sind bei den mit Ethanol vorbehandelten Ratten angestiegen (SGOT: 257±16, SGPT: 93±10, SGLDH: 57±7 U/l), während allein mit CCl_4 behandelte Ratten relativ niedrigere Konzentrationen an Serum-Transaminasen aufwiesen (SGOT: 163±13, SGPT: 33±6, SGLDH: 36±6 U/l). Die Abatmung von anderen Kohlenwasserstoffen wie Ethylen, Propan, n-Butan und i-Buten stieg durch die Vorbehandlung mit Ethanol nicht an (Abb. 22). Zusammen mit den oben genannten Ergebnissen aus der

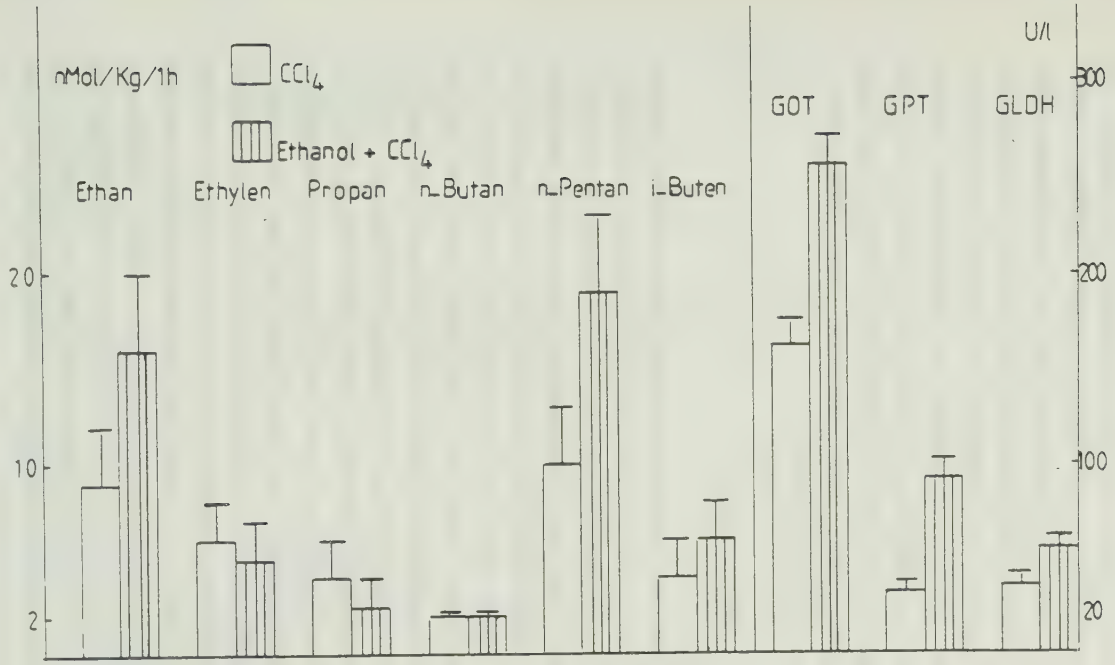

Abbildung 22: Einfluß von akutem Ethanol (4 g/kg i.p. 5 Stunden vor der Tetrachlormethan-Behandlung) auf die toxische Wirkung von Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.) bei weiblichen SIV-Ratten. Die Kohlenwasserstoffe wurden 2 Stunden nach der Tetrachlormethan-Behandlung bestimmt. Nach der Bestimmung der Kohlenwasserstoffe wurden die Ratten sofort getötet und die Serum-Enzyme bestimmt. (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

Literatur deutet dies darauf hin, daß in diesem Fall das Ethanol selbst an der Erhöhung der Toxizität beteiligt ist.

Um zu untersuchen, ob auch nach dem Verschwinden des Ethanols die Lipidperoxidation verstärkt wird oder nicht, erhielten gefütterte Mäuse 8 Stunden vor der CCl_4-Gabe 4 g/kg Ethanol oral (per Schlundsonde). Das Ethanol wurde als 30%ige Lösung gegeben. CCl_4 wurde unverdünnt i.p. injiziert in einer Dosis von 0.4 ml/kg; eine Stunde nach der CCl_4-Gabe wurden die Mäuse in den Exsikkator gesetzt und die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe bestimmt. Aus Abb. 23 geht hervor, daß die Ethan- und n-Pentan-Abatmung bei Mäusen, die mit Ethanol vorbehandelt worden waren, etwas höher lag als bei solchen, die nur CCl_4 erhielten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war aber nicht signifikant.

III.3.3 Ethanol und Paracetamol

Anders als bei CCl_4 ist die Wirkung von akutem Ethanol auf die Hepatotoxizität von Paracetamol. Eine Vorbehandlung der Ratten mit 6 g/kg Ethanol 6 Stunden vor Paracetamol-Gabe verringerte die Hepatotoxizität von Paracetamol (gemessen an den Serum-Transaminasen). Die Bindung von Paracetamol oder seiner Metaboliten an Leberproteine wurde nicht beeinflußt. Es wurden auch keine Lebernekrosen gefunden, wenn die Ratten vorher mit Ethanol vorbehandlet worden waren (Sato und Lieber 1981; Sato et al. 1981). Eine gleichzeitige Gabe von Ethanol und Paracetamol schützte die Mäuse vor der hepatotoxischen Wirkung des Paracetamols (Wong et al. 1980).

Bei den jetzigen Experimenten erhielten weibliche NMRI-Mäuse, die vorher 50 Stunden gehungert hatten, eine Stunde vor der Paracetamol-Behandlung (500 mg/kg i.p.) 2 g/kg Ethanol (i.p.). Eine Stunde nach der Paracetamol-Gabe wurden die Mäuse in den Exsikkator gesetzt und die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe 3 Stunden gesammelt und dann bestimmt; danach wurden die Mäuse getötet und die Serum-Transaminasen bestimmt. Die Vorbehandlung mit Ethanol verringerte drastisch die Abatmung von Ethan und n-Pentan (andere Gase wie Ethylen, Propan und Butan wurden durch die Behandlung mit Ethanol nicht beeinflußt); dagegen fanden sich große Streuungen in den Werten der Serum-Transaminasen, so daß der Schutzeffekt sich hier als nicht signifikant erwies (Abb. 24 a,b).

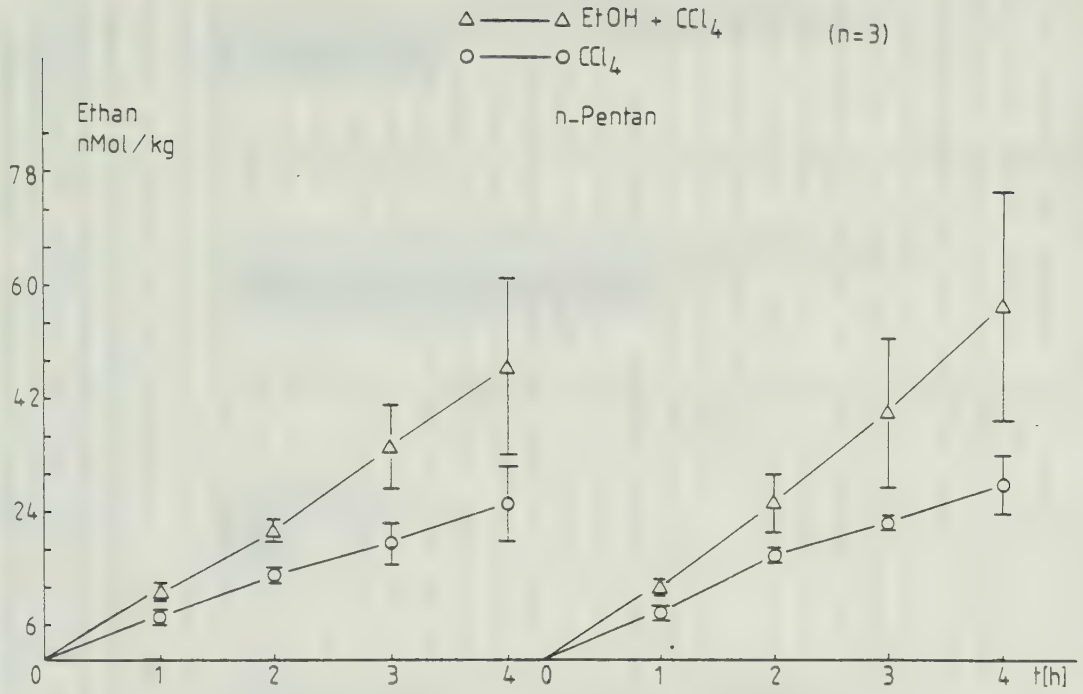

Abbildung 23: Einfluß von Ethanol-Vorbehandlung (4 g/kg p.o. 8 Stunden vor Tetrachlormethan-Gabe) auf Ethan und n-Pentan-Abatmung bei über Nacht gehungerten weiblichen NMRI-Mäusen. (Mittelwert und Standardabweichung)

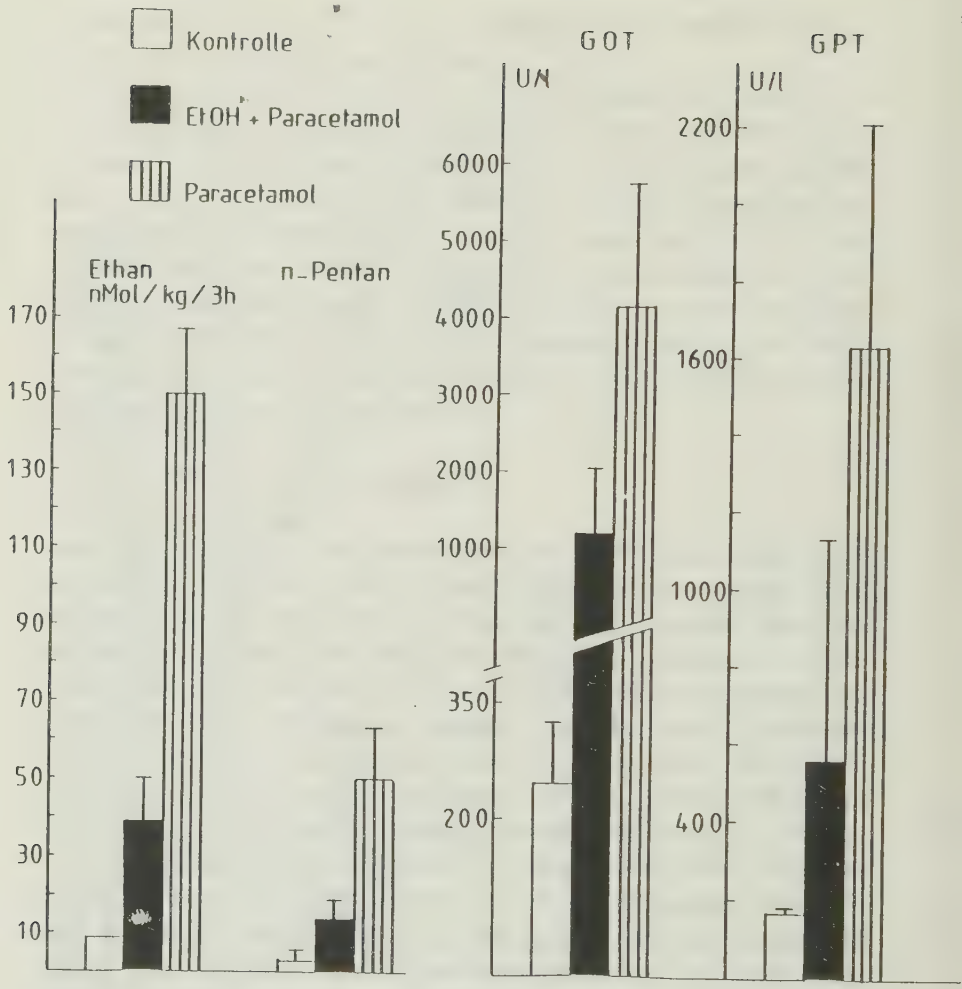

Abbildung 24 a,b: Einfluß von akutem Ethanol (2 g/kg i.p. eine Stunde vor Paracetamol-Gabe) auf die Kohlenwasserstoffexhalation und Serumtransaminasen (SGPT und SGOT) nach der Intoxikation mit Paracetamol (500 mg/kg eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion) bei 50 Stunden gehungerten weiblichen NMRI-Mäusen. (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

III.3.4 Ethanol und Eisen

Die Entstehung von Malondialdehyd nach akuter Ethanol-Behandlung wurde von Di Luzio und Hartman (1967) nachgewiesen und später von Videla et al. (1980) bestätigt. Den Anstieg von Serum-Transaminasen nach akutem Ethanol (orale Gabe) konnten Teschke et al. (1983) nachweisen. In perfundierten Rattenlebern fanden Sies et al. (1982) eine vermehrte Ethan-Produktion nach Ethanol-Gabe. Dies wurde jedoch von Remmer et al. (1984) nicht bestätigt. Nach akuter Intoxikation mit Ethanol fanden Kalish und Di Luzio (1966) eine relativ große Menge an peroxidierten Fettsäuren. Um die Fettsäurehydroperoxide zerfallen zu lassen, benutzten Menzel und Donavan (1978) Eisenionen (in vitro). Sie inkubierten ein ω-6-Hydroperoxid (Methyl-13-hydroperoxy-6,9,11-octatrienoat) mit Fe^{++}-Ionen und konnten mit diesem Modell Pentan quantitativ bestimmen.

Um zu untersuchen, ob Ethanol die Lipidperoxidation verstärkt oder nicht, erhielten jetzt gefütterte weibliche NMRI-Mäuse 2 g/kg Ethanol (i.p.) eine Stunde vor der Behandlung mit Eisensulfat injiziert. Die Mäuse erhielten 200 mg/kg Eisensulfat (40 mg/kg Fe^{++}, i.p.), das in bidestilliertem Wasser gelöst war (kurz vor dem Versuch 200 mg Eisensulfat in 20 ml bidest.). Nach der Eisen-Applikation wurden die Mäuse für 5 Stunden zur Gaskollektion im Exsikkator gehalten. Danach wurden sie getötet und die Serum-Transaminasen sowie der Malondialdehyd in der Leber bestimmt.

Die Ethan-Exhalation bei Mäusen, die mit Eisen bzw. mit Ethanol und Eisen behandelt waren, erreichte nach einer Stunde etwa 40 nMol/kg; nach weiteren 2 Stunden kam es bei mit Eisen behandelten Mäusen zum Stillstand der Ethanabatmung, während sie bei mit Ethanol und Eisen behandelten weiterging und nach 5 Stunden ca. 280 nMol/kg (Mittelwert) erreichte.

Bei der n-Pentan-Exhalation wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Eisen-, Ethanol- oder Kontroll-Mäusen gefunden. Mäuse, die Eisen oder Ethanol erhielten, exhalierten während der ersten 3 Stunden erhöhte Mengen n-Pentan, doch änderte sich die Konzentration in der Gasphase in den weiteren 2 Stunden nicht mehr. Dies könnte eventuell auf die hemmende Wirkung des Ethanols bzw. des Eisens auf das entsprechende Abbau-Enzym-System hinweisen.

Nur mit Ethanol oder mit Ethanol und Eisen behandelte Mäuse atmeten die gleichen Mengen an Ethylen (mehr als 30 nMol/kg in 5 Stunden) ab. Mäuse

die nur Eisen erhielten, exhalierten die gleiche Menge an Ethylen wie Kontrollmäuse (8-10 nMol/kg in 5 Stunden). Ähnlich wie bei der Ethylen-Abatmung war es bei der Exhalation von n-Butan: Es wurde kein signifikanter Unterschied der n-Butan-Exhalation zwischen Mäusen, die Ethanol erhielten, und denjenigen, die Ethanol und Eisen erhielten, gefunden.

Ethanol- und Eisen-behandelte Mäuse exhalierten relativ große Mengen an i-Buten (fast 40 nMol/kg in 5 Stunden). Bei allen anderen Gruppen (Ethanol- oder Eisen- und Kontroll-Mäuse) wurde keine nennenswerte Menge an i-Buten gefunden.

Da eine große Menge an i-Buten exhaliert wird, wenn die Mäuse vorher mit Ethanol behandelt worden waren (siehe Abb. 19) und dies nach und nach abgebaut wird, kann vermutet werden, daß Ethanol den enzymatischen Abbau des i-Butens hemmt.

Die Behandlung mit Eisen führte zu einem signifikanten Anstieg von Ethan und Pentan über die Kontrollwerte, aber nicht von Ethylen, Propan, Butan und i-Buten. Behandlung mit Ethanol hatte dagegen einen signifikanten Anstieg von Ethylen, Propan und Butan zur Folge. i-Buten wird unter Ethanol zunächst vermehrt abgeatmet, aber im Laufe der Zeit abgebaut und war deshalb nach der langen Versuchszeit von 5 Stunden nicht mehr nachweisbar. Der hohe Wert bei der mit Ethanol und Eisen behandelten Gruppe geht darum wahrscheinlich auf eine Zerstörung von Cytochrom P-450 durch Eisenionen zurück, so daß keine Metabolisierung von i-Buten mehr stattfinden konnte. Recknagel et al. (1982) fanden, daß die Inkubation von Lebermikrosomen mit Eisen-Ionen (Fe^{++}) zu einer starken Abnahme der Cytochrom-P-450-Konzentration in den Mikrosomen führte.

Ethanol-Gabe (i.p.) verursachte innerhalb von 6 Stunden einen Anstieg der Serum-Transaminasen (Abb. 25 a-d).

Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von Strubelt et al. (1972). Sie sahen den Anstieg der Serum-Transaminasen nach i.p. Applikation von Ethanol als einen lokalschädigenden Effekt des hochkonzentrierten Ethanols. Später fanden Teschke et al. (1983) einen Anstieg der Serum-Transaminasen nach einmaliger oraler Gabe von Ethanol (4 g/kg). Bei Meerschweinchen wurde ebenfalls nach akuter Ethanol-Gabe (4.8 bzw. 6.4 g/kg oral) eine Erhöhung von Serum-Transaminasen gefunden (Strubelt et al. 1974).

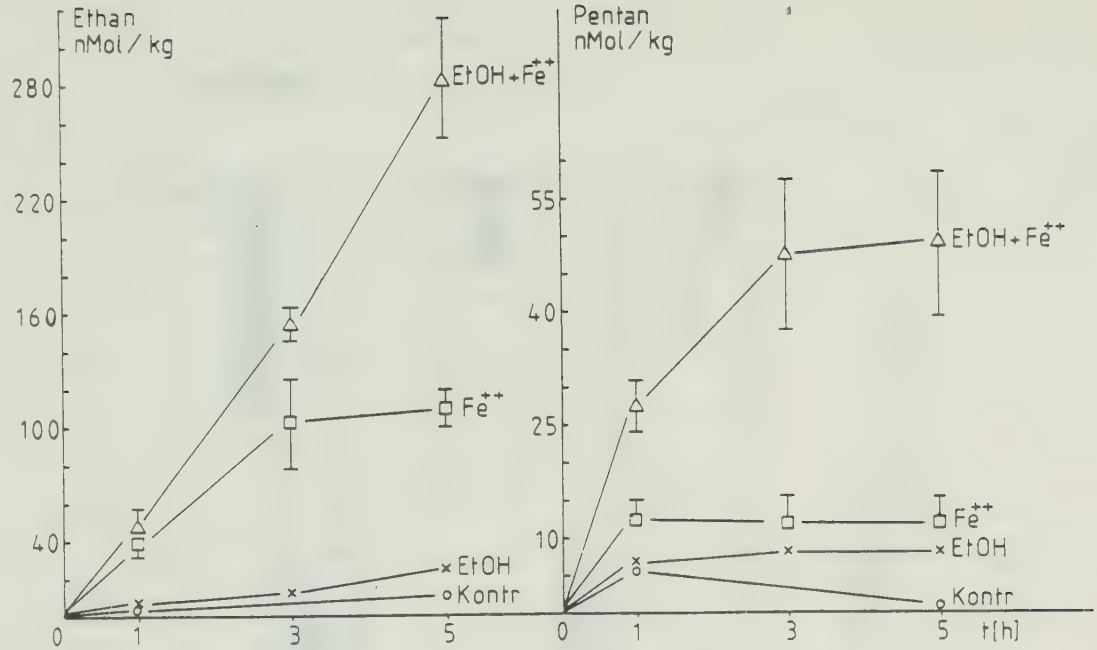

Abbildung 25 a: Einfluß von akutem Ethanol (2 g/kg i.p. eine Stunde vor der Eisen-Gabe) auf die Abatmung gasförmiger Kohlenwasserstoffe und das Niveau von MDA, SGPT und SGOT nach der Behandlung mit Eisensulfat ($FeSO_4 \times 7H_2O$ 200 mg/kg i.p.; entspricht 40 mg Fe^{++}/kg) bei gefütterten weiblichen NMRI-Mäusen. Das Eisensulfat wurde zwei Minuten vor der Gaskollektion gegeben. MDA, SGOT und SGPT wurden sofort nach der Gasbestimmung ermittelt.

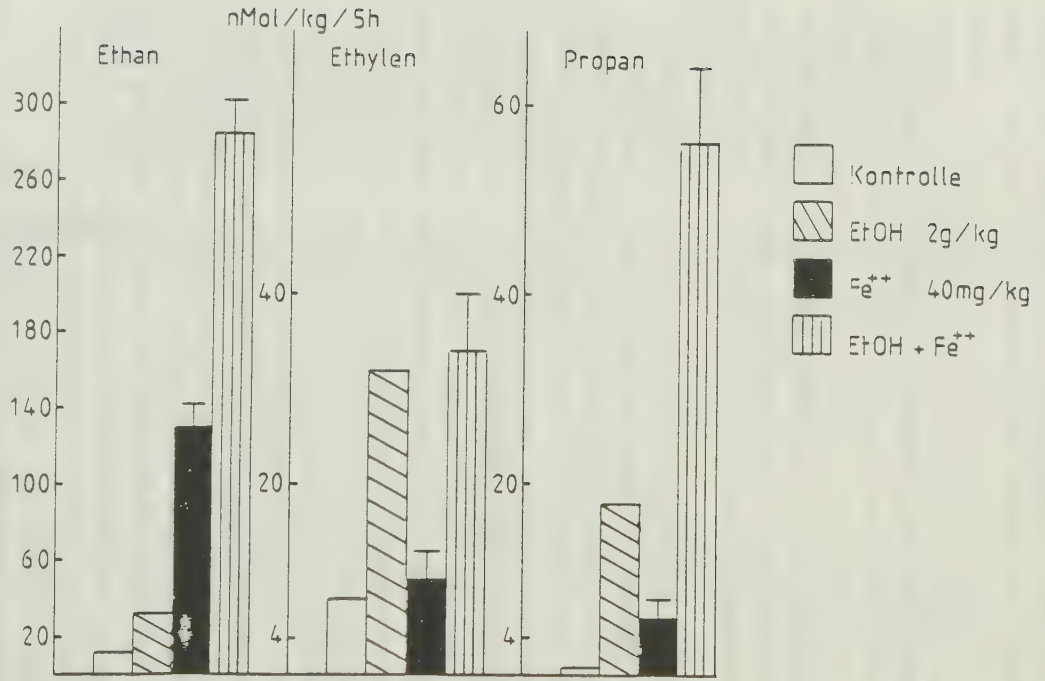

Abbildung 25 b: siehe Abb. 25 a

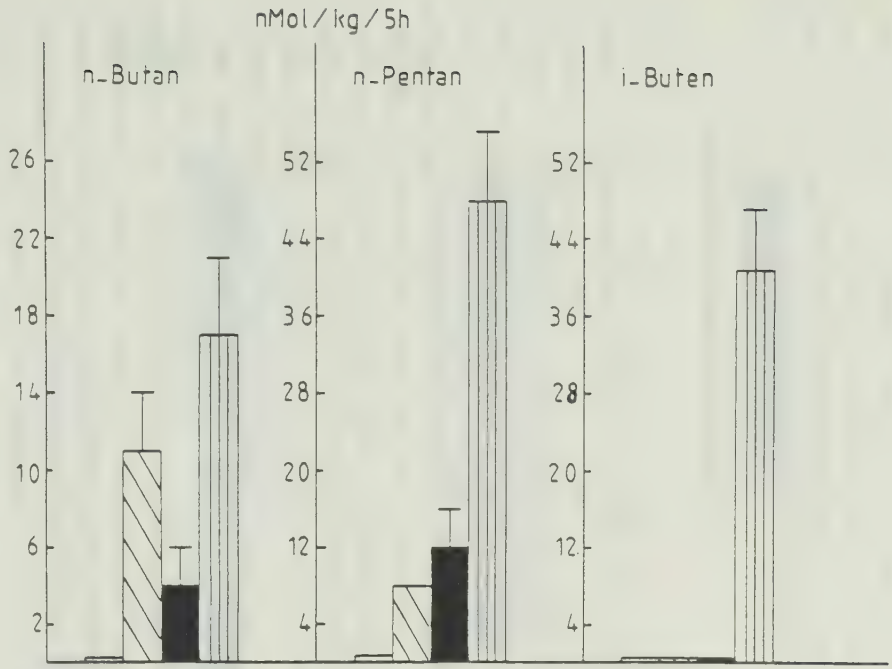

Abbildung 25 c: siehe Abb. 25 a

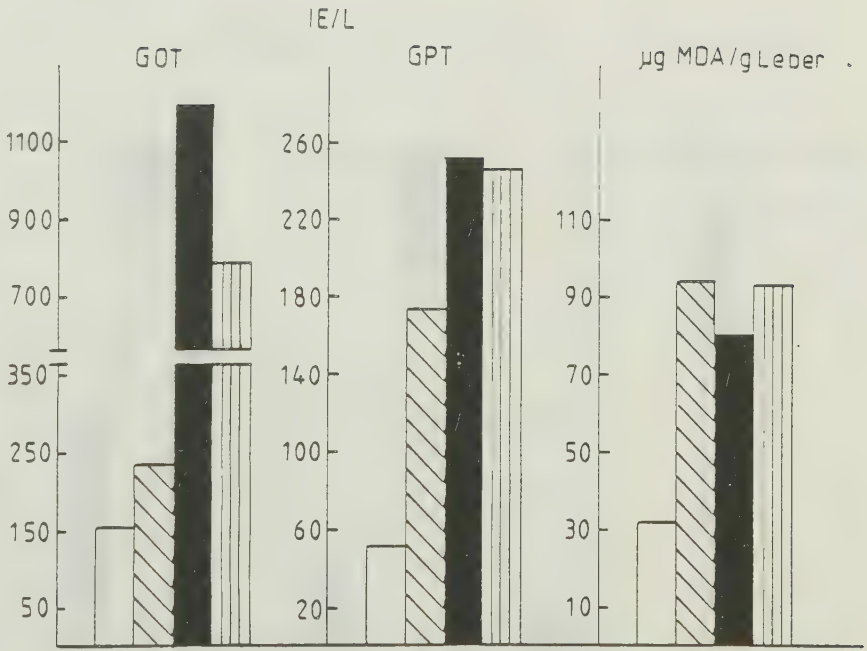

Abbildung 25 d: siehe Abb. 25 a

Die Entstehung von Malondialdehyd in der Leber nach akutem Ethanol wurde von Comporti et al. (1973) nachgewiesen. Videla et al. (1980) konnten dies bestätigen, allerdings nur bei 16 Stunden nüchtern gesetzten Ratten, die 5 g/kg Ethanol erhielten (nicht weniger). (Das Malondialdehyd wurde 6 Stunden nach Ethanol-Gabe bestimmt).

Bei den jetzigen Experimenten wurde 6 Stunden nach der Behandlung von Mäusen mit Ethanol (2 g/kg i.p.) vermehrt Malondialdehyd nachgewiesen (Abb. 25 a-d). Auch in den Lebern von Mäusen, die Eisen oder Ethanol und Eisen erhielten, wurde eine erhöhte Malondialdehyd-Konzentration gefunden.

III.3.5 Ethanol und Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid schützte Mäuse vor der hepatotoxischen Wirkung von Paracetamol, Brombenzol und Thioacetamid, zeigte aber keine Schutzwirkung gegenüber CCl_4 (Siegers 1978).

In vitro wurde die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd durch Dimethylsulfoxid oder 2-Keto-4-thioethylbuttersäure (KTBA) gehemmt; und umgekehrt wurde die Methanentwicklung aus Dimethylsulfoxid bzw. die Ethylenentwicklung aus KTBA gehemmt, wenn vorher Ethanol zugesetzt worden war (Cederbaum et al. 1977, 1978, 1979 und 1980). Das System, das in der Lage war, Ethanol, Dimethylsulfoxid und KTBA zu metabolisieren, bestand aus Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und Phospholipid. Ob es sich um eine Hemmung des Cytochrom P-450 oder um ein Abfangen von $OH^{\bullet}$-Radikalen handelt, ist bislang ungeklärt.

Jetzt wurden weibliche SIV-Ratten zuerst mit Ethanol (5 ml/kg i.p.) und eine Stunde danach mit Dimethylsulfoxid (5 ml/kg i.p.) behandelt; Kontroll-Ratten erhielten Dimethylsulfoxid, Ethanol oder eine isotonische Kochsalzlösung. Danach wurden die Ratten in den Exsikkator gesetzt und die abgeatmeten Mengen an Methan gaschromatographisch bestimmt. Wie Abb. 26 zeigt, hemmte Ethanol die Entwicklung von Methan aus Dimethylsulfoxid. Die Ratten exhalierten Methan, das von methanogenen Darmbakterien stammt.

III.4 DER EINFLUSS VON CHRONISCHEM ETHANOL AUF DIE LIPIDPEROXIDATION BEI VERSCHIEDENEN DIÄTEN

Um zu untersuchen, ob Ethan und n-Pentan tatsächlich aus den ungesättigten

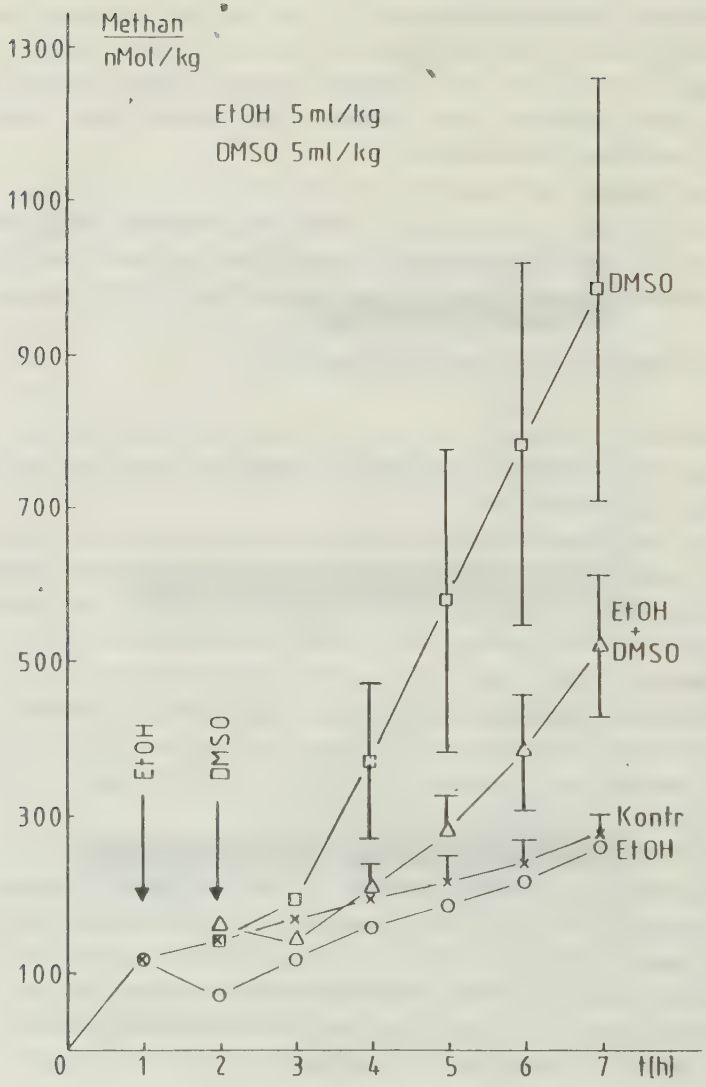

Abbildung 26: Hemmung der Methanabatmung durch Vorbehandlung mit Ethanol bei weiblichen SIV-Ratten. Ethanol (5 ml/kg i.p.) wurde eine Stunde vor Dimethylsulfoxid (5 ml/kg i.p.) gegeben. (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

Fettsäuren (ω-3 und ω-6) stammen, wurden weibliche SIV-Ratten mit zwei verschiedenen Diäten gefüttert. Dabei wurde auch der Einfluß von Ethanol bei verschiedenen Diäten untersucht.

Die Ratten wurden in drei Gruppen aufgeteilt: die erste Gruppe erhielt Futter, das Fischöl enthält, die zweite Gruppe erhielt Futter, das Maisöl enthält, die dritte Gruppe erhielt Standardfutter (Altromin).

Jede dieser Gruppen wurde nochmals in drei Untergruppen aufgeteilt, wobei die erste Untergruppe jeweils normales Trinkwasser erhielt, die zweite Saccharose im Trinkwasser und die dritte Ethanol im Trinkwasser.

Die mit Ethanol behandelten Ratten wiesen unter allen Diäten einen Gewichtsrückstand gegenüber denjenigen Ratten auf, die Wasser oder Saccharoselösung tranken (Abb. 27-29). Die Kalorienaufnahme war etwas geringer (Abb. 30).

Nach 15, 25 und 35 Tagen Diät bekamen die Ratten vor der Alkan-Messung eine Dosis CCl_4 (0.4 ml/kg i.p.). Eine Stunde nach der CCl_4-Applikation wurden die Ratten in den Exsikkator gesetzt und eine Stunde lang die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe gesammelt und gaschromatographisch bestimmt. Die Tabellen 8, 9 und 10 zeigen die Mengen an abgeatmeten Kohlenwasserstoffen sowie das Verhältnis von n-Pentan zu Ethan.

An einzelnen Versuchstagen zeigten Ethanol-behandelte Ratten eine höhere Abatmung von Ethan und Pentan als die Tiere der Saccharose-Gruppe. Die Unterschiede waren jedoch nicht regelmäßig nachweisbar.

Die anderen abgeatmeten Kohlenwasserstoffe wie Ethylen, Propan und n-Butan wurden weder durch das Futter noch durch Ethanol beeinflußt (Tab. 8). Tabelle 9 zeigt, daß Fütterung der Ratten mit Ethanol die Abatmung von Kohlenwasserstoffen weder qualitativ noch quantitativ verändert (mit Ausnahme von Methan, das hier nicht gemessen wurde). Es bestätigt sich bei Gabe von Ethanol und Saccharose im Trinkwasser der unter III.4 für Ratten mit normalem Wasser (Tab. 8) beschriebene Befund, daß das Verhältnis Pentan/Ethan unter Maisöldiät höher ist als unter Fischöldiät.

III.5 ENTSTEHUNG VON KOHLENWASSERSTOFFEN DURCH DIE METABOLISIERUNG VON FREMDSTOFFEN

Es ist sehr fraglich, ob die Metabolisierung mancher Substanzen durch das

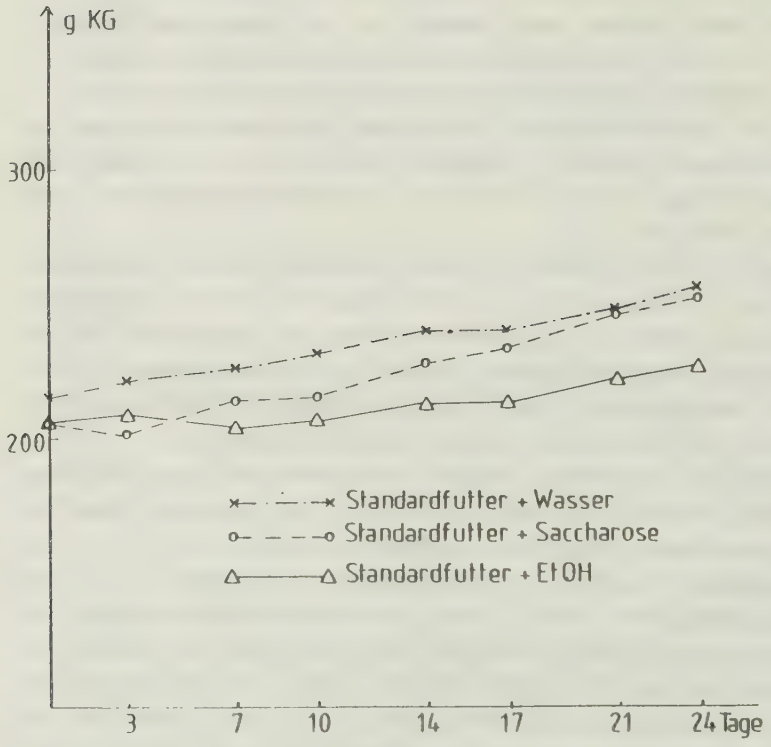

Abbildung 27: Wachstumsverlauf bei weiblichen SIV-Ratten bei der Haltung mit unterschiedlichen Diäten. Standardfutter: Altromin C 1320; chronisch Ethanol: Ethanol-Lösung (20% w/v); chronisch Saccharose: Saccharose-Lösung (32% w/v).

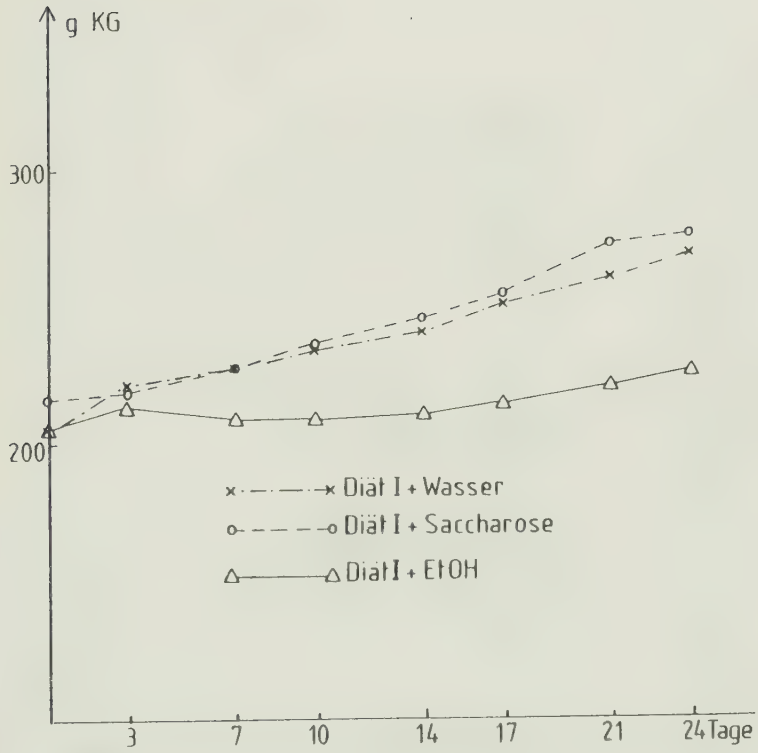

Abbildung 28: Wachstumsverlauf bei weiblichen SIV-Ratten bei der Haltung mit unterschiedlichen Diäten. Diät I: Maisöl als Fettquelle; chronisch Ethanol: Ethanol-Lösung (20% w/v); chronisch Saccharose: Saccharose-Lösung (32% w/v)

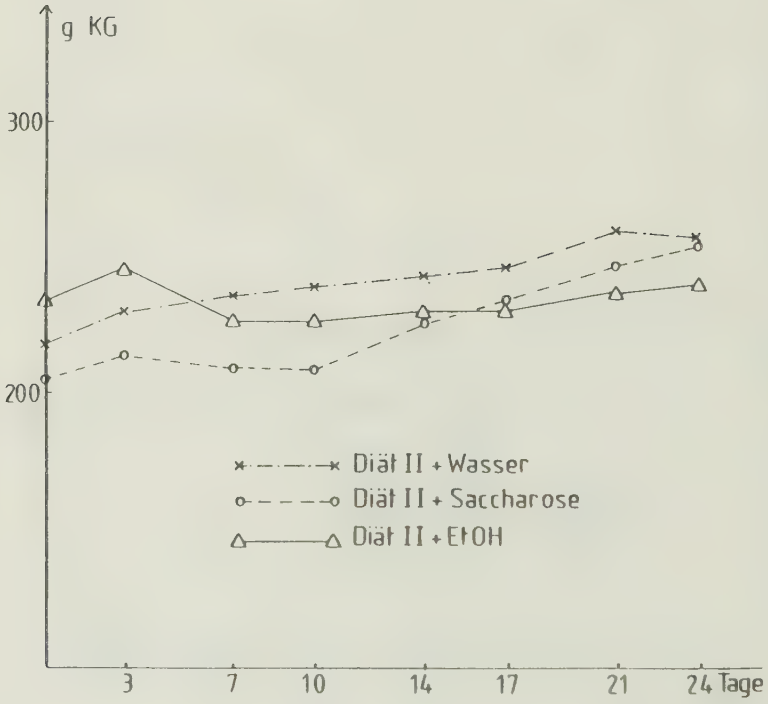

Abbildung 29: Wachstumsverlauf bei weiblichen SIV-Ratten bei der Haltung mit verschiedenen Diäten. Diät II: Fischöl als Fettquelle; chronisch Ethanol: Ethanol-Lösung (20% w/v); chronisch Saccharose: Saccharose-Lösung (32% w/v).

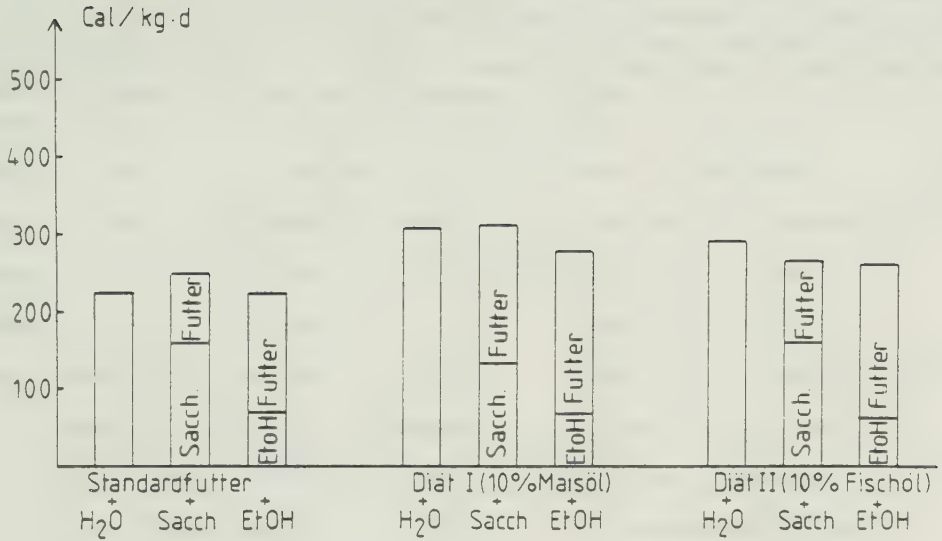

Abbildung 30: Kalorienverbrauch der Ratten bei verschiedenen Diäten.

Tabelle 8: Einfluß der Fütterung mit Fischöldiät oder Maisöldiat auf die Kohlenwasserstoffexhalation bei weiblichen SIV-Ratten nach der Intoxikation mit Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.). Die Ratten wurden über Nacht nüchtern gesetzt, erhielten aber Wasser ad lib.; das Tetrachlormethan wurde eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion appliziert. (Mittelwerte und Standardabweichung, n=4)

	15 Diättage		25 Diättage	
	Fischöldiät	Maisöldiät	Fischöldiät	Maisöldiät
	nMol/kg/1h			
Ethan	31±9	10±2	54±8	18±5
Ethylen	3±1	3±0.0	4±8	3±0.0
Propan	3±1	3±1	3±1	2±0.0
Butan	2±1	2±1	3±1	3±1
Pentan	21±5	17±4	35±8	38±13
Pentan/ Ethan	0.68	1.70	0.65	2.11

Tabelle 9: Einfluß der Fütterung mit verschiedenen Diäten auf die Ethan- und Pentan-Abatmung bei weiblichen SIV-Ratten (die Saccharose oder Ethanol im Trinkwasser erhielten) nach der Intoxikation mit Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.). Die Ratten wurden über Nacht nüchtern gesetzt, erhielten aber Wasser ad lib.; das Tetrachlormethan wurde eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion appliziert. (Mittelwerte und Standardabweichung, n=4)

		Fischöldiät		Maisöldiät	
		Saccharose	Ethanol	Saccharose	Ethanol
		nMol/kg/1h			
Diättage					
15	Ethan	13±2	27±5	10±2	12±2
	Pentan	13±2	13±2	28±5	28±4
25	Ethan	17±2	25±5	9±4	18±2
	Pentan	13±1	17±8	18±10	34±4
35	Ethan	21±4	27±3	15±3	14±4
	Pentan	16±4	16±3	29±4	29±9

Tabelle 10: Einfluß der Fütterung mit verschiedenen Diäten (35 Tage lang) (sowie Trinkwasser oder Trinkwasser+Saccharose oder Trinkwasser+Ethanol) auf die Kohlenwasserstoffabatmung bei weiblichen SIV-Ratten nach der Intoxikation mit Tetrachlormethan (0.4 ml/kg i.p.). Vor Versuchsbeginn wurden die Ratten über Nacht nüchtern gesetzt, erhielten aber Wasser ad lib. (Mittelwerte und Standardabweichung, n=4)

	Standardfutter			Maisöldiät		Fischöldiät	
	Saccharose	Wasser	Ethanol	Saccharose	Ethanol	Saccharose	Ethanol
	nMol/kg/1h						
Ethan	12±3	24±4	25±5	15±3	14±4	21±4	27±3
Ethylen	5±2	5±3	6±2	4±2	3±2	6±2	5±2
Propan	2±1	3±1	5±1	4±2	4±2	3±2	4±2
Butan	2±1	4±2	4±2	3±2	4±2	2±1	3±2
Pentan	16±6	34±7	32±6	29±4	27±9	16±4	16±3
Pentan/ Ethan	1.3	1.4	1.28	1.93	1.92	0.76	0.59

mikrosomale abbauende Enzymsystem zur Entstehung von Kohlenwasserstoffen aus diesen Substanzen führt.

In vivo konnten Nelson et al. 1975 nachweisen, daß beim Abbau von Iproniazid (Isopropylisoniazid) Propan entsteht. Die Bildung von Ethylen (in vitro) aus Methional oder 2-Keto-4-thiomethylbuttersäure sowie die Entstehung von Methan aus Dimethylsulfoxid wurde von Cederbaum et al. (1980) nachgewiesen.

Die Entstehung von Ethylen aus Ethionin und von Methan aus Dimethylsulfoxid (in vivo) wurde in dieser Arbeit nachgewiesen (siehe Abb. 31 b und Abb. 26).Die Abatmung von i-Buten nach Ethanolbehandlung bei Ratten und Mäusen wurde schon von Hintze (1981) beobachtet, aber noch nicht gedeutet. Die Abbildungen 19 und 21 zeigen, daß dieses Gas sehr wahrscheinlich aus L-Leucin entsteht. Die genauen Mechanismen, wie aus L-Leucin i-Buten gebildet wird, sind jedoch bis jetzt nicht geklärt.

III.6 DER EINFLUSS VON ETHIONIN AUF DIE KOHLENWASSERSTOFFABATMUNG

Ethionin ist ein Hepatotoxin, das eine ähnliche Struktur wie Methionin aufweist. Eine akute Dosis Ethionin verursacht eine Leberverfettung; bei chronischer Behandlung mit Ethionin entwickeln sich Leberzirrhosen und Leberkarzinome. Einige toxische Wirkungen des Ethionins lassen sich durch Gabe von Methionin aufheben.

Das Ausmaß der Toxizität ist spezies- und geschlechtsabhängig (Timbril 1982). Es wird vermutet, daß Ethionin einen Mangel an ATP verursacht: Methionin wirkt in vivo als Methyl-Gruppen-Donator in Form von S-Adenosyl-methionin, während mit Ethionin das entsprechende S-Adensosyl-ethionin gebildet wird. Da das Adenosin im S-Adenosyl-ethionin (im Gegensatz zum S-Adenosyl-methionin) nicht wieder zurückgewonnen werden kann und damit dem Adeninnukleotid-Stoffwechsel als ATP-Prekursor verlorengeht, kommt es mit der Zeit zu einem Mangel an Adenin und damit an ATP.

Um zu untersuchen, ob Ethylen aus Ethionin in vivo entstehen kann, wurden gefütterte weibliche NMRI-Mäuse mit 1 g/kg oder 0.5 g/kg Ethionin (i.p.) behandelt. Eine Stunde nach der Behandlung wurden die Mäuse in den Exsikkator gebracht. Die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe wurden gesammelt

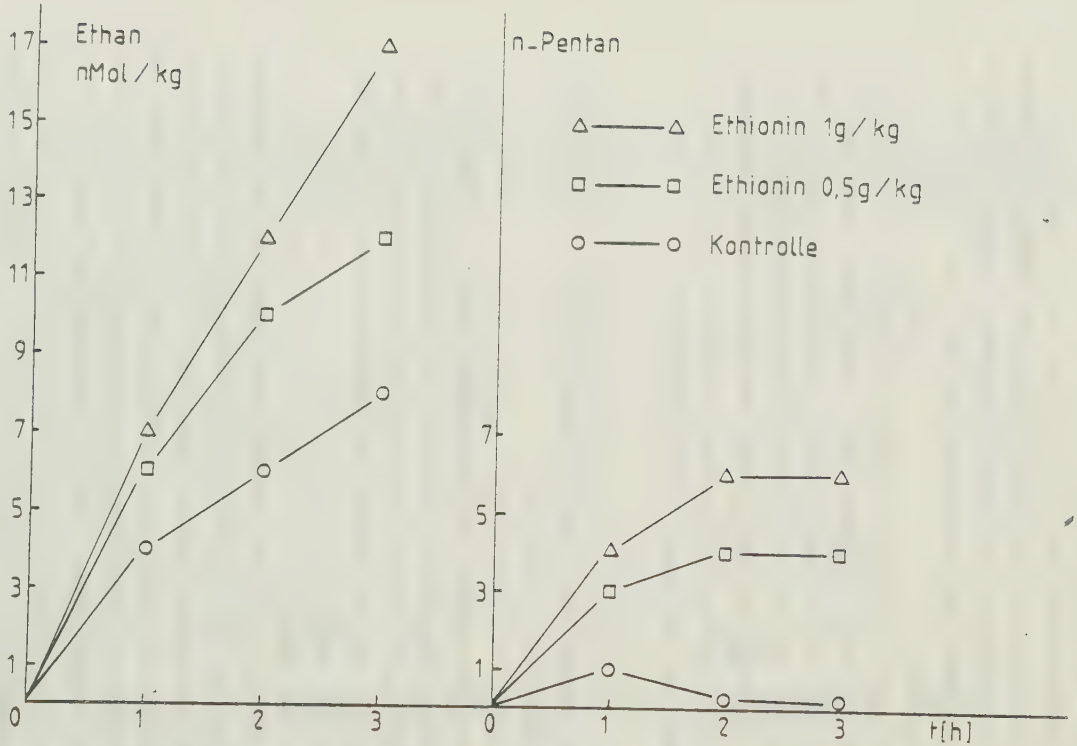

Abbildung 31 a: Kohlenwasserstoffexhalation bei gefütterten weiblichen NMRI-Mäusen nach der Behandlung mit Ethionin (1.0 g/kg und 0.5 g/kg i.p.).

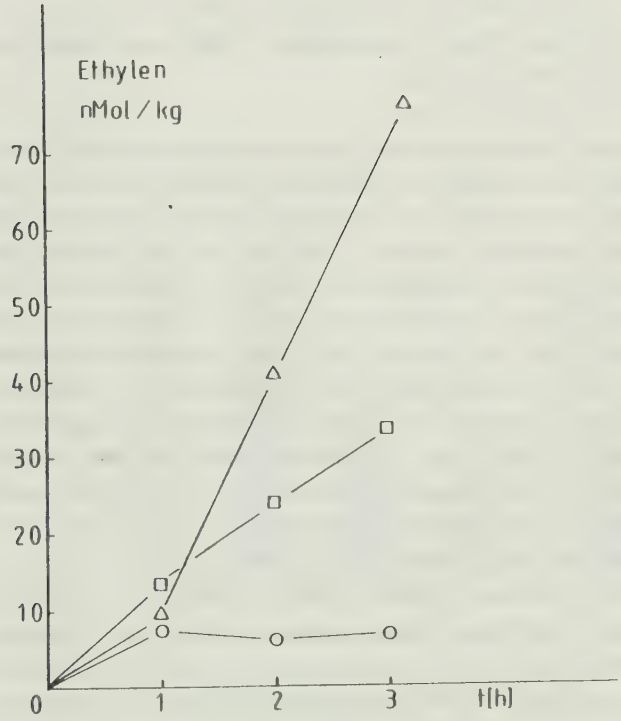

Abbildung 31 b: siehe Abb. 31 a

und gaschromatographisch bestimmt. Ethan, Ethylen und n-Pentan stiegen im Laufe der Zeit an; Propan, n-Butan und Isobuten waren nicht nachweisbar. Insbesondere zeigt dieser Versuch einen dramatischen Anstieg von Ethylen (Abb. 31 a,b). Dies deutet darauf hin, daß Kohlenwasserstoffe auch aus anderen Quellen entstehen können als aus ungesättigten Fettsäuren. Die Entstehung von Ethylen aus Ethionin kann aber nicht unbedingt mit der Toxizität von Ethionin in Zusammenhang gebracht werden.

III.7 DER EINFLUSS VON BROMBENZOL AUF DIE KOHLENWASSERSTOFFABATMUNG

Brombenzol verursacht Lebernekrosen bei Labortieren; die Toxizität ist bei verschiedenen Spezies unterschiedlich ausgeprägt (Mitchell et al. 1971). Eine Vorbehandlung der Ratten mit 3-Methylcholanthren verringert die Lebertoxizität von Brombenzol; umgekehrt wurde sie bei der Vorbehandlung mit Phenobarbital verstärkt (Zampaglione et al. 1973). Hypoxie verstärkt nicht die Toxizität von Brombenzol; ein signifikanter Anstieg der Serum-Transaminasen war erst 48 Stunden nach der Brombenzol-Applikation festzustellen (Strubelt und Breining 1980). Brombenzol erniedrigte den Glutathionspiegel in der Leber (in vivo) und in isolierten Hepatocyten (Thor et al. 1982). Es wurde aber kein MDA gefunden; auch der Nachweis einer H_2O_2-Entstehung blieb negativ (Orrenius et al. 1982). Hungernde Mäuse (24 Stunden) waren von der Toxizität des Brombenzols stärker betroffen als nicht gefütterte (Strubelt et al. 1981).

Mäuse, die vorher 50 Stunden gehungert hatten, erhielten 1.0 ml/kg Brombenzol i.p. injiziert; eine Stunde danach wurden die Mäuse in den Exsikkator gesetzt und die abgeatmeten Kohlenwasserstoffe bestimmt. Hierbei wurde kein dramatischer Anstieg der Kohlenwasserstoffe gefunden, wie er sich zum Beispiel bei Paracetamol oder CCl_4 zeigte: Nach 3 Stunden war der Ethan-Gehalt auf etwa 17 nMol/kg angestiegen, während Kontrollmäuse im selben Zeitraum 8 bis 9 nMol/kg exhalierten. Auch für Ethylen und n-Pentan wurde nur eine Zunahme in der Größenordnung wie bei Ethan festgestellt (Abb. 32). Im weiteren wurde versucht, durch Brombenzol den Glutathion-Spiegel zu senken; hierbei (Abb. 33) wurden gefütterte Mäuse zuerst mit 0.5 ml/kg Brombenzol behandelt, um den Glutathion-Spiegel zu senken, 4 Stunden

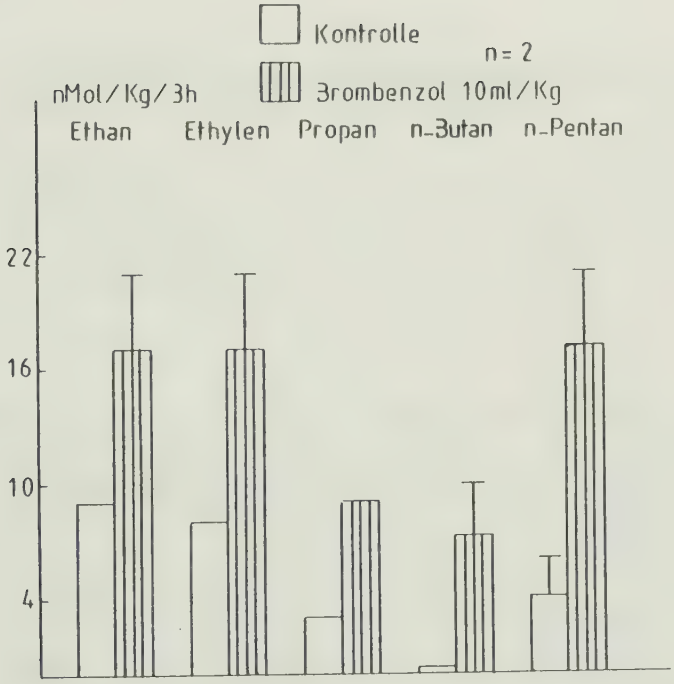

Abbildung 32: Abatmung von Kohlenwasserstoffen nach der Intoxikation mit Brombenzol (1.0 ml/kg i.p.) bei weiblichen NMRI-Mäusen, die vorher 50 Stunden gehungert haben. Die Mäuse erhielten jedoch Wasser nach Belieben. (Mittelwert und Standardabweichung, n=2)

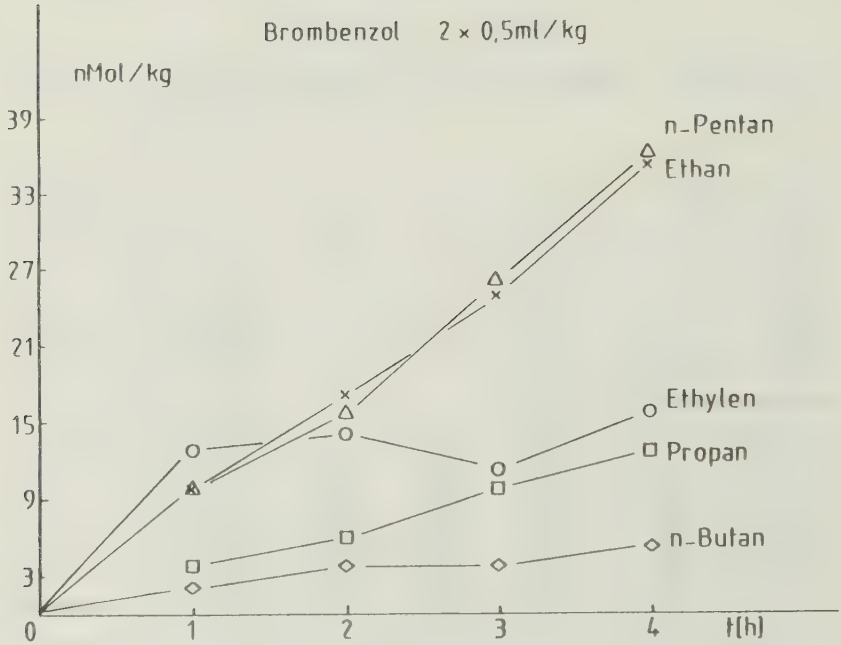

Abbildung 33: Exhalation von Kohlenwasserstoffen nach der Intoxikation mit Brombenzol bei gefütterten weiblichen NMRI-Mäusen. Brombenzol (0.5 ml/kg i.p.) wurde zweimal injiziert, das erstemal 5 Stunden vor Beginn der Gaskollektion, das zweitemal eine Stunde vor Beginn der Kollektion.

danach wurde den Mäusen nochmals 0.5 ml/kg Brombenzol i.p. verabreicht. Dann wurden die Kohlenwasserstoffe bestimmt: Ethan und n-Pentan stiegen parallel und nahezu linear an und erreichten nach 4 Stunden einen Wert von 36 nMol/kg. Auch Propan nahm zeitabhängig zu, nicht jedoch Ethylen und n-Butan.

III.8 KOHLENWASSERSTOFFABATMUNG NACH DER INTOXIKATION MIT 2-FURAMID ODER THIOPHEN

Thiophen- und 2-Furamid-Intoxikationen verursachen Nieren- und Lebernekrosen bei Ratten und Mäusen. Bei Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren verstärkte sich die Toxizität oder verschob sich von einem Organ zum anderen (McMurtry und Mitchell 1977).

III.8.1 2-Furamid

Abbildung 34 zeigt den Einfluß der Induktion durch Phenobarbital bzw. 3-Methylcholanthren auf die Abatmung von Ethan und n-Pentan bei weiblichen NMRI-Mäusen (gefüttert) nach der Intoxikation mit 2-Furamid (Furan-2-carbonsäureamid). Phenobarbital-vorbehandelte Mäuse atmeten relativ große Mengen an Ethan und n-Pentan ab. Die Ethanmenge entsprach nach der ersten Stunde ca. 10 nMol/kg, nach der zweiten mehr als 40 nMol/kg und nach der dritten über 80 nMol/kg. Die Pentanabatmung bei diesen Mäusen erreichte nach 3 Stunden ca. 50 nMol/kg (Mittelwert).

Auch 3-Methylcholanthren-induzierte Mäuse exhalierten große Mengen an Kohlenwasserstoffen. Die Mortalität (in 10 Stunden nach der Toxingabe) war bei diesen Mäusen jedoch geringer als bei Mäusen, die mit Phenobarbital vorbehandelt worden waren (Tab. 11).

Mäuse, die nur 2-Furamid erhielten (250 mg/kg und ohne Vorbehandlung) exhalierten in 3 Stunden mehr Ethan (20 nMol in 3 Stunden) als unbehandelte Mäuse (8 nMol/kg in 3 Stunden); beide Gruppen exhalierten kein Pentan (Abb. 34).

Ratten, die 2-Furamid (300 mg/kg i.p.) erhielten, atmeten die gleichen Mengen an Ethan und n-Pentan ab (Abb. 35). Dies wurde noch deutlicher, wenn die Ratten vorher mit Phenobarbital behandelt waren und zusätzlich

Tabelle 11: Einfluß der Induktion mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) oder 3-Methylcholanthren (20 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) auf die Kohlenwasserstoffexhalation bei gefütterten weiblichen NMRI-Mäusen nach der Behandlung mit 2-Furamid. (Mittelwerte und Standardabweichung)

Behandlung	2-Furamid mg/kg	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	Mortalität in 10h	Mortalität in 48h	n
		nMol/kg in 4-5h							
Kontrolle	-	11±2	8±2	3±1	3±3	3±3	0/4	0/4	4
2-Furamid	250	28±3	33±3	16±2	9±1	0±0	0/4	0/4	4
Pb 2-Furamid	250	174±76	31±2	15±3	18±4	122±73	4/4	-	4
MC 2-Furamid	250	70±20	22±4	10±2	11±3	71±30	1/3	2/3	3

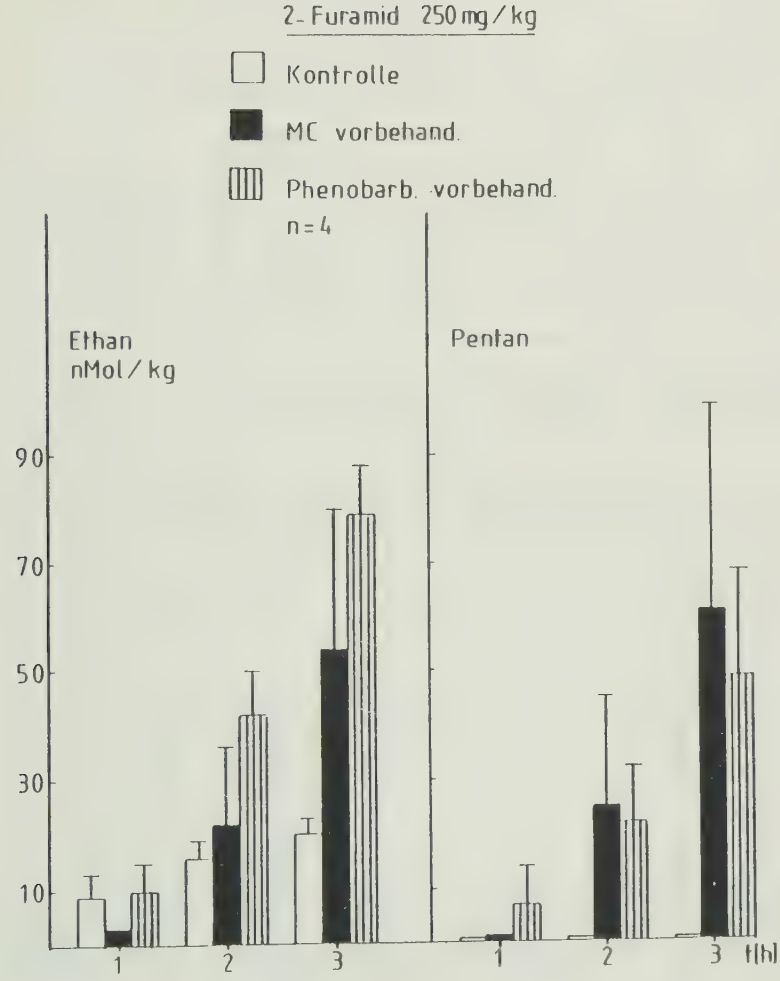

Abbildung 34: Einfluß der Vorbehandlung mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) oder 3-Methylcholanthren (20 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch weibliche NMRI-Mäuse (gefüttert). 2-Furamid (250 mg/kg i.p.) wurde eine Stunde vor dem Versuchsbeginn gegeben.

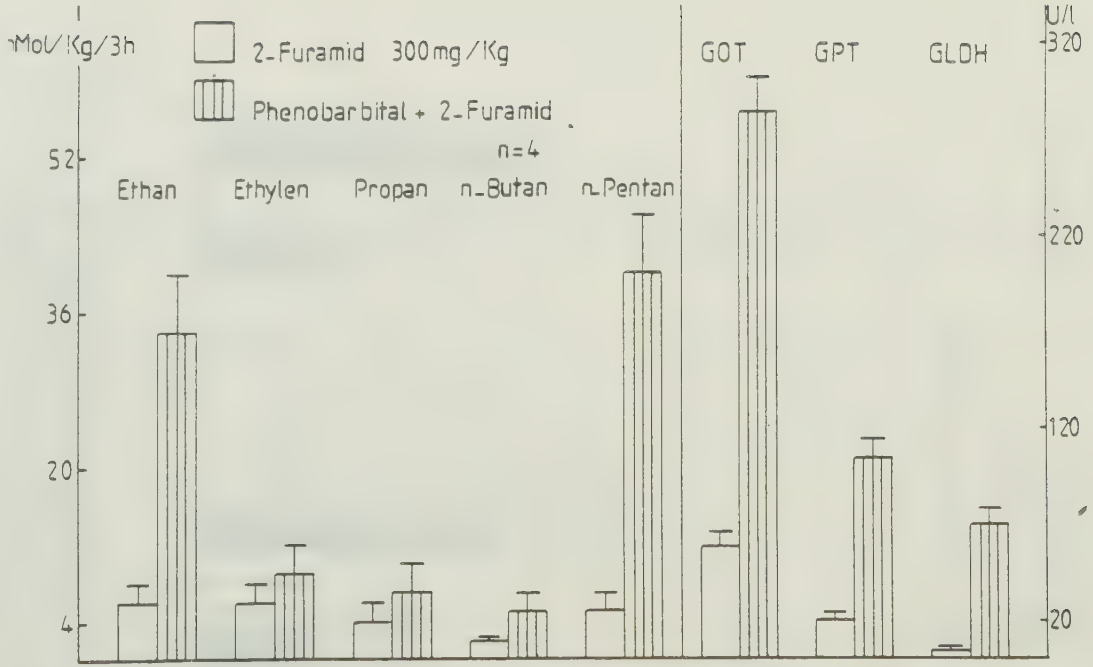

Abbildung 35: Einfluß von 2-Furamid (300 mg/kg i.p. eine Stunde vor dem Versuch) auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen bei weiblichen SIV-Ratten, die vorher 24 Stunden gehungert haben. Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage); die Kontrollratten erhielten die gleiche Menge an Flüssigkeit in Form isotonischer Kochsalzlösung. SGOT, SGPT und GLDH wurden direkt nach der Kohlenwasserstoff-Bestimmung im Serum gemessen. (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

eine Hungerperiode von 24 Stunden hinter sich hatten. Nicht gehungerte (Phenobarbital-induzierte) Ratten exhalierten nach der Intoxikation mit 2-Furamid (300 mg/kg) 7 nMol/kg in 3 Stunden an Ethan und etwa 6 nMol/kg in 3 Stunden an n-Pentan. Dagegen kam es bei Ratten, die gleich behandelt waren, aber 24 Stunden gehungert haten, zu einer starken Abatmung an Ethan (26 nMol/kg in 3 Stunden) und n-Pentan (30 nMol/kg in 3 Stunden). Andererseits läßt sich ein deutlicher Einfluß der Vorbehandlung nachweisen: Hungernde Ratten, die Phenobarbital erhalten hatten, exhalierten nach Furamid-Gabe 4mal soviel Ethan und Pentan wie unvorbehandelte, denen das Futter entzogen worden war. Andere Kohlenwasserstoffe wie Ethylen, Propan und n-Butan stiegen bei diesen Versuchen nicht signifikant an (siehe Abb. 35). Das heißt, daß bei Ratten weder der Hungerzustand noch die Induktion allein ausreicht, um die Lipidperoxidation auszulösen; vielmehr müssen beide Faktoren zusammenwirken, was bei Mäusen nicht der Fall ist.

Daß Phenobarbital-Vorbehandlung bei den gefasteten Ratten die Toxizität von 2-Furamid erhöhte, ist auch aus den Werten der Serum-Transaminasen ablesbar. Sie waren 4-fach höher als bei Ratten, die nur 2-Furamid erhalten hatten (Abb. 35). Auch die Ethan- und n-Pentan-Abatmung war bei Phenobarbital-Vorbehandlung 4-fach stärker als bei Ratten, die nicht vorbehandelt waren.

Wie Induktion und Ernährungszustand (gefüttert oder gehungert) die Kohlenwasserstoffabatmung nach der Intoxikation mit 2-Furamid bei Ratten beeinflussen, zeigt zusammenfassend Abb. 36 a,b und 37.

III.8.2 Thiophen

Der Einfluß der Induktion mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren auf die Kohlenwasserstoffabatmung nach der Intoxikation mit Thiophen war differenzierter als nach der Intoxikation mit 2-Furamid: Nur die Induktion mit Phenobarbital und nicht jene mit 3-Methylcholanthren hatte einen starken Einfluß auf die Kohlenwasserstoffabatmung und die Mortalität bei Mäusen, die eine Dosis Thiophen (300 mg/kg) erhielten (Tab. 12).

Phenobarbital-vorbehandelte Mäuse, die 300 mg/kg Thiophen i.p. erhielten, exhalierten in der ersten Stunde etwa 15 nMol/kg, in der zweiten fast 25 nMol/kg und in der dritten mehr als 50 nMol/kg Ethan. Die Pentanexhalation war der des Ethan ähnlich. Dagegen exhalierten die Mäuse, die mit

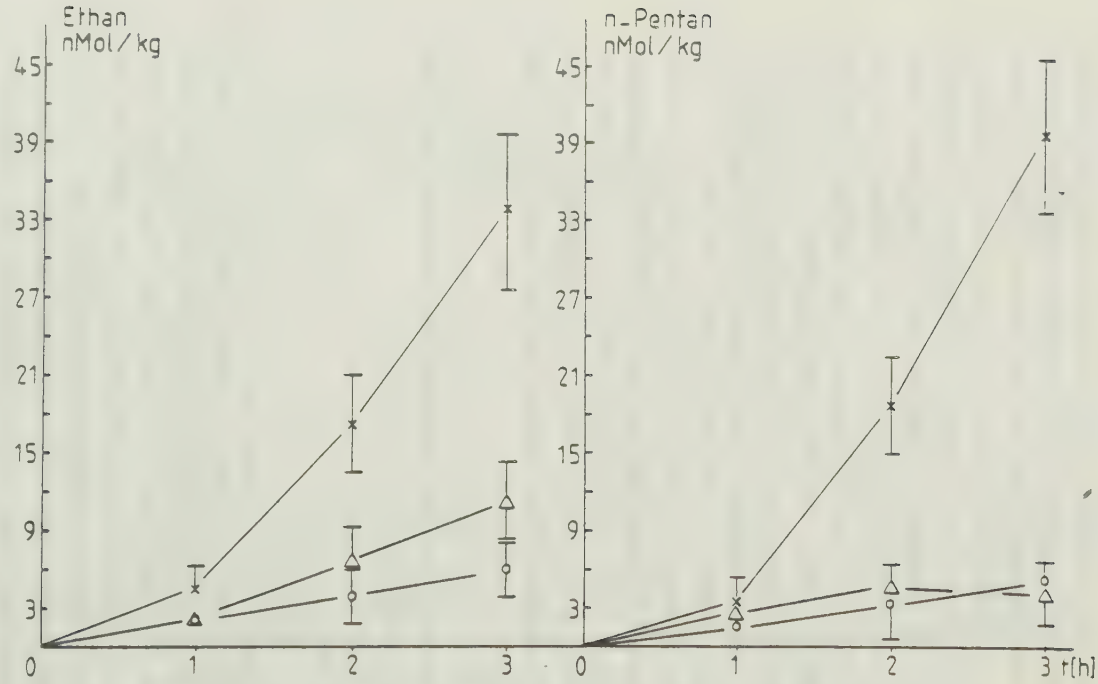

Abbildung 36 a: Einfluß von Futterentzug (24 Stunden) und Vorbehandlung mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich über 3 Tage) auf die Kohlenwasserstoff-Exhalation nach der Intoxikation mit 2-Furamid (300 mg/kg i.p. eine Stunde vor Beginn der Gaskollektion) bei weiblichen SIV-Ratten.

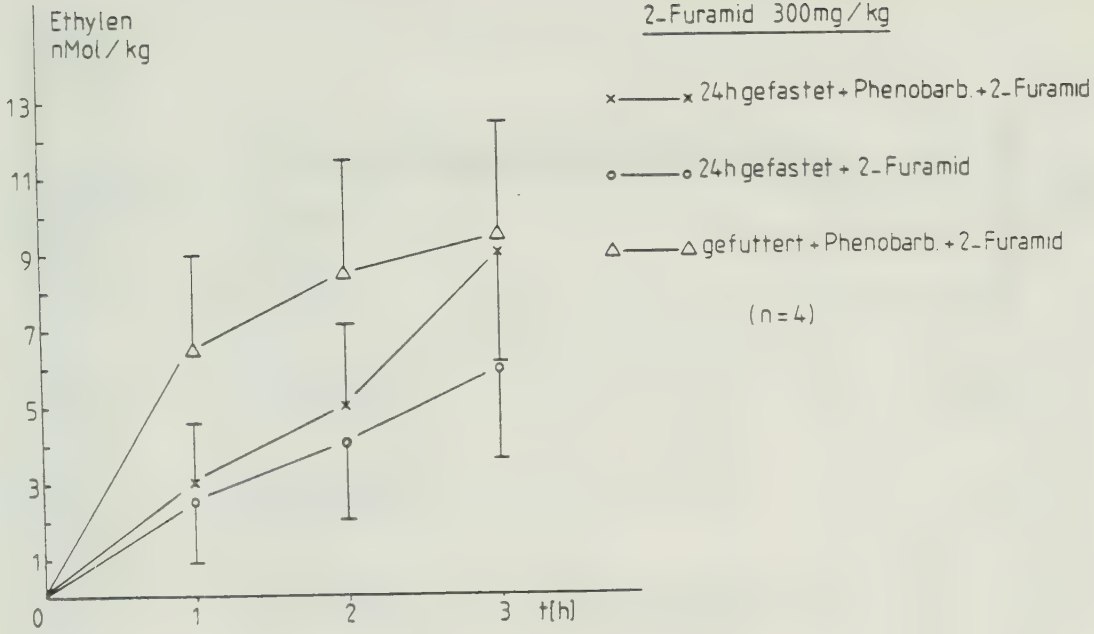

Abbildung 36 b: siehe Abb. 36 a

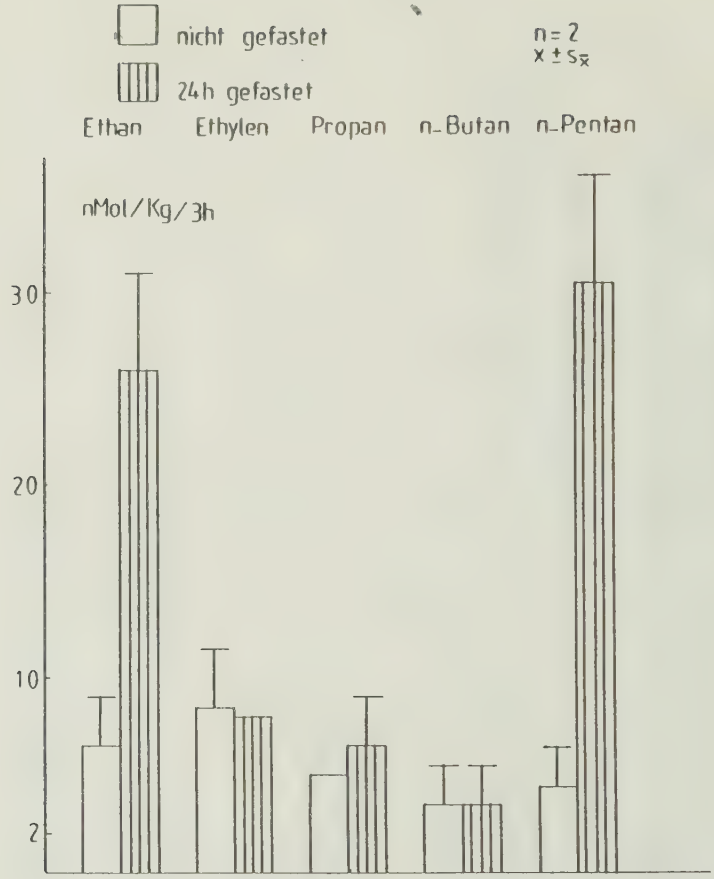

Abbildung 37: Einfluß von Futterentzug (24 Stunden ohne Futter, aber Wasser nach Belieben) auf die Exhalation von Kohlenwasserstoffen durch weibliche SIV-Ratten, die mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) vorbehandelt waren. Eine Stunde vor dem Versuch erhielten die Ratten 2-Furamid (300 mg/kg i.p.).

Tabelle 12: Einfluß der Induktion mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) oder 3-Methylcholanthren (20 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) auf die Kohlenwaserstoffexhalation bei gefütterten weiblichen NRMI-Mäusen nach der Behandlung mit Thiophen. (Mittelwerte und Standardabweichung)

Behandlung	Thiophen mg/kg	Ethan	Ethylen	Propan	n-Butan	n-Pentan	Mortalität in 20h	Mortalität in 48h	n
		nMol/kg in 4-5h							
Kontrolle	-	11±2	8±2	3±1	3±3	3±3	0/4	0/4	4
Thiophen	300	16±1	23±2	10±2	13±3	32±3	0/4	0/4	4
MC Thiophen	300	20±3	24±3	12±2	16±2	41±7	0/4	0/4	4
Pb Thiophen	300	93±36	23±4	18±8	17±8	170±34	3/3	-	3

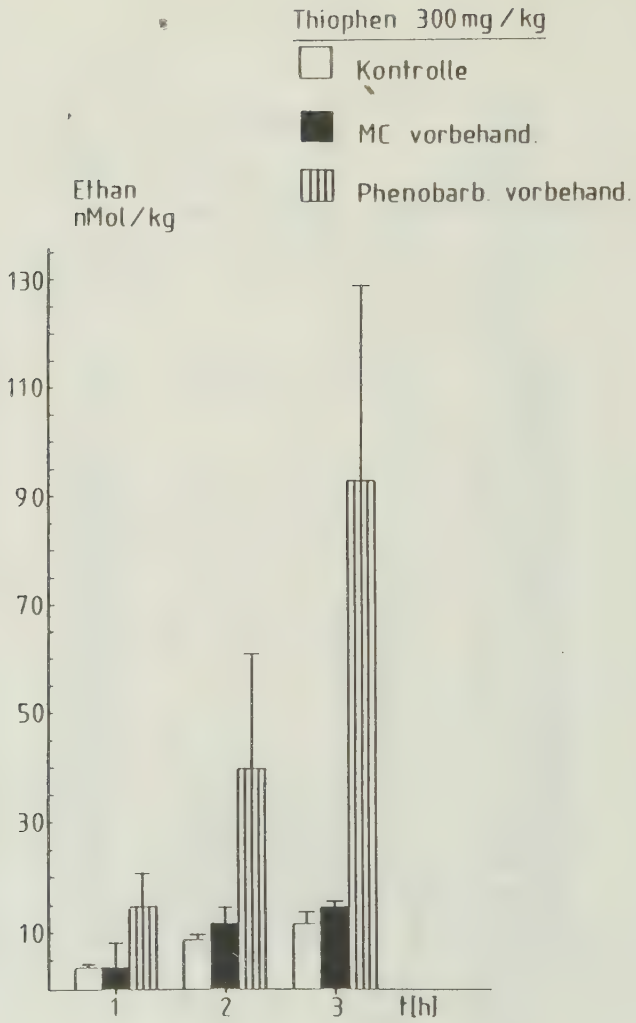

Abbildung 38 a: Abatmung von Kohlenwasserstoffen nach der Behandlung mit Thiophen (300 mg/kg i.p.) bei weiblichen NMRI-Mäusen (gefüttert), die mit Phenobarbital (100 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) oder mit 3-Methylcholanthren (20 mg/kg i.p. 1×täglich für 3 Tage) behandelt wurden; die Kontrolltiere erhielten statt dessen eine isotonische Kochsalzlösung. (Mittelwert und Standardabweichung, n=4)

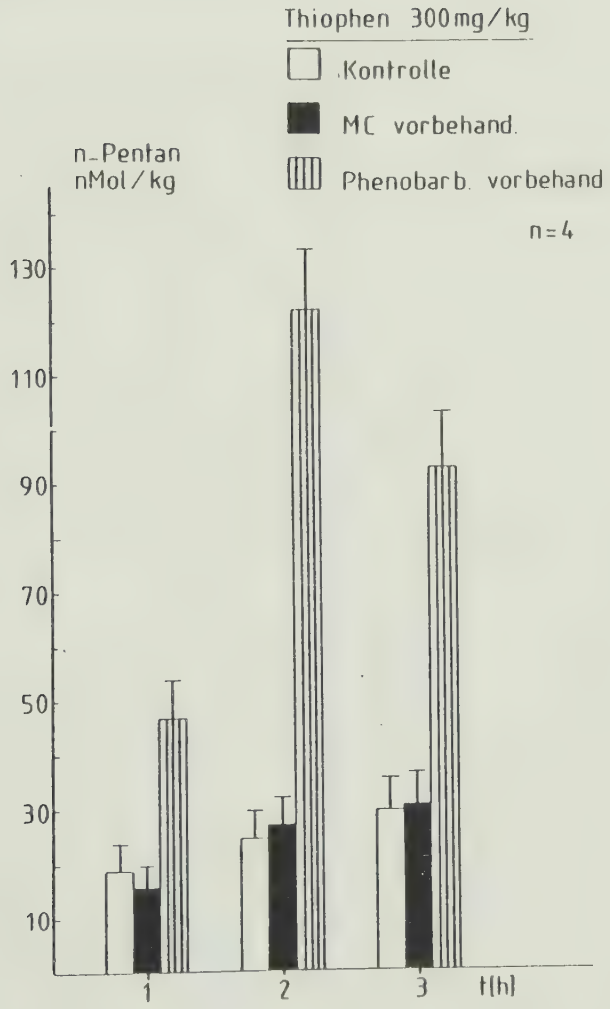

Abbildung 38 b: siehe Abb. 38 a

3-Methylcholanthren vorbehandelt waren und Thiophen erhielten, bzw. Mäuse, die nur Thiophen bekamen, eine relativ kleine Menge an n-Pentan (15 nMol/kg in 3 Stunden) (Abb. 38 a,b).

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die Cytochrom-P-450 abhängige Monooxygenase, welche den Organismus gegen die überflutung durch Fremdstoffe schützt, ist auch für die toxische Wirkung zahlreicher chemischer Stoffe verantwortlich. Bei der Oxidation im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen entstehen toxische Zwischenprodukte, wie Epoxide und Radikale, welche mit Lipiden, Proteinen und der DNS reagieren. Polyungesättigte Fettsäuren kommen in relativ hoher Konzentration in den Lipiden der Membran vor, in welche die Monooxygenase eingebettet ist. Sie werden leicht von Radikalen angegriffen, die ein H-Atom abstrahieren, wodurch die Fettsäuren nach Aufnahme von O_2 in Peroxyradikale umgewandelt werden. Sie reagieren weiter und führen letztlich zu einer Abspaltung von Ethan aus ω-3- und Pentan aus ω-6-ungesättigten Fettsäuren. Dabei spielt komplexiertes Fe als Katalysator eine wichtige Rolle (siehe Einleitung, Abb. 1).

Die leicht flüchtigen Kohlenwasserstoffe werden abgeatmet und können in der Ausatmungsluft gemessen werden. So ist es möglich, in vivo nicht-invasiv eine im Organismus, vor allem in der Leber, ablaufende Lipidperoxidation zu verfolgen. Dieses Verfahren wurde von Riely et al. (1974) zum ersten Mal beschrieben und darauf von verschiedenen Arbeitsgruppen angewandt (Dillard et al. 1977, Frank et al. 1980b).

Die Aufgabe der beschriebenen Experimente war es, mit Hilfe bekannter leberschädigender chemischer Substanzen herauszufinden, inwieweit dieses einfach zu handhabende 'in-vivo'-Verfahren in der Toxikologie zum Nachweis von Lipidperoxidation und weiterer radikalischer Prozesse anwendbar ist. Leberschädigung durch toxische Stoffe wurde bisher fast ausschließlich mit histologischen Untersuchungen und mit Messungen des Enzymaustrittes aus den geschädigten Zellen ins Blut verifiziert. Das letztere Verfahren wurde hier zum Vergleich herangezogen.

Durch Versuche einer anderen Arbeitsgruppe im Institut war bereits bekannt, daß die unter physiologischen Bedingungen im Körper entstehenden Kohlenwasserstoffe nur zum Teil abgeatmet werden, da die hauptsächlich in den Leberzellen vorkommende Monooxygenase diese Gase oxydiert, wobei die Geschwindigkeit vom Ethan über Ethylen, Propan, Butan bis hin zum Pentan

und i-Buten ansteigt. Jede Schädigung des Enzyms oder auch jede Hemmung des Abbaus durch andere Substanzen führt zu einer Erhöhung der abgeatmeten Alkanmenge (Frank et al. 1980a, Remmer und Gharaibeh 1984).

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise dafür, daß die bei der Lipidperoxidation freigesetzten Mengen an Ethan und Pentan abhängig sind von der Beschaffenheit der ungesättigten Fettsäuren in den Lipiden. Daher wurde der Frage nachgegangen, in welchem Ausmaß das Verhältnis von Ethan und Pentan in der Atemluft sich verschiebt, wenn Ratten 2 verschiedene Diäten erhalten, die eine reich an Maisöl, die andere an Fischöl. Zur Auslösung der Lipidperoxidation diente eine niedrige Dosis CCl_4, die nur zu einer reversiblen Leberschädigung führt. Nach einer Maisölnahrung wird fast doppelt soviel Pentan wie Ethan abgeatmet. Beinahe umgekehrt ist das Verhältnis, wenn die Tiere Fischöl als Fette im Futter erhielten. Das verschiedene Verhältnis spiegelt die unterschiedliche Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren wider. Diese Versuche bestätigen, daß die Fettsäurenzusammensetzung der Lipide in der Leberzelle nicht konstant ist, sondern von den Nahrungsfetten abhängt. Sie bekräftigen weiter die Annahme, daß abgeatmetes Ethan und Pentan zu einem wesentlichen Teil aus dem Zerfall von ungesättigten Fettsäuren stammen.

Da neben diesen beiden Kohlenwasserstoffen noch weitere auftreten, wenn auch fast immer in verhältnismäßig geringen Mengen, muß mit der Herkunft aus anderen biologischen Substanzen gerechnet werden. Auffallend ist die starke Abatmung von Isobuten nach akuter Gabe von Ethanol, die erstmals von Hintze (1981) beobachtet wurde. Jetzt konnte gezeigt werden, daß dieses offenbar aus Leucin stammt, denn kombinierte Behandlung von Mäusen mit Leucin und Ethanol erhöhte die Isobuten-Menge weit über das Maß dessen hinaus, was mit Ethanol allein gefunden wurde (Abb. 19 und 20), und auch in vitro setzte Leberhomogenat aus Leucin Isobuten frei (Abb. 21).

Ethanolbehandlung (akut und chronisch) erhöhte die Plasma-Konzentration an verzweigten Aminosäuren (Shaw und Lieber 1978). Ob die Hemmung des Aminosäurenabbaus in der Leber durch Ethanol mit der Toxizität des Ethanols zu tun hat, ist bis jetzt nicht erwiesen. In isolierten perfundierten Rattenlebern fanden Isselbacher und Greenberger (1964) eine Hemmung der Oxidation von Leucin (bis zu 70%) nach der Gabe von Ethanol (400 mg per 100 ml). Diese Versuche wurden auch in vivo bestätigt. Ward et al. (1985a, 1985b) fanden in vivo nach einer Dosis Ethanol von 8 g/kg bei

Ratten eine Abnahme der Leucin-Oxidation. Das Verhältnis NAD^+:NADH in der Leber und den Nieren wurde durch Ethanol erniedrigt. Chronische Ethanolbehandlung (28 Tage) beeinflußte jedoch nicht die Leucin-Oxidation.

Weitere Gase können aus den verwendeten Hepatotoxinen stammen, z.B. Ethylen aus Ethionin (Abb. 31 a) und Methan aus Dimethylsulfoxid (Abb. 26). Dies entspricht der Beobachtung von Nelson et al. (1975), daß nach Gabe von Iproniazid vermehrt Propan exhaliert wird.

In den meisten der beschriebenen Experimente stammen jedoch die Kohlenwasserstoffe aus endogenen Substanzen. Dabei vermehrten die verschiedenen Hepatotoxine die Abatmung einzelner Gase in unterschiedlichem Ausmaß.

Bei Mäusen führen Tetrachlormethan- und Brombenzol-Intoxikation hauptsächlich zur Vermehrung von Pentan, daneben von 1-Buten und in geringem Maße zum Anstieg weiterer Kohlenwasserstoffe. Im Gegensatz dazu exhalieren hungernde Mäuse unter Paracetamol stark gesteigerte Mengen an Pentan und Ethan, aber nicht an Isobuten. Nach Thiophen-Behandlung fällt die starke Vermehrung von Pentan auf bei wesentlich geringerer Wirkung auf Butan und Propan; 2-Furamid schließlich hatte nur mäßige Auswirkungen, die bei Propan relativ am stärksten waren (Tab. 11). Die Tabellen 13 und 14 (im Tabellenanhang) zeigen die Steigerung in Prozent der Kontrollwerte nach 1 und 3 Stunden Einwirkung der verschiedenen Hepatotoxine. Vergleicht man deren Wirkungen, so läßt sich feststellen, daß ausgeprägte Erhöhungen der Pentan-Werte gefütterter Mäuse unter CCl_4, Thiophen und Brombenzol auftreten, die alle sehr lipophile Substanzen sind. Man kann vermuten, daß die aus ihnen durch Cytochrom P-450 gebildeten Radikale noch lipophilen Charakter besitzen, sich deshalb in Lipidmembranen aufhalten und dort Fettsäuren angreifen. Damit kommt es zur Lipidperoxidation und Pentanbildung. Für die hydrophilen Hepatotoxine Paracetamol und 2-Furamid spielt dieser Mechanismus vielleicht eine geringere Rolle. Sie steigern die Exhalation mehrer Kohlenwasserstoffe in vergleichbarem Ausmaß. Daraus könnte man schließen, daß die Radikale nicht nur Fettsäuren, sondern auch Proteine und Aminosäuren angreifen, die sich im wässrigen Milieu befinden.

Ratten exhalierten sowohl nach CCl_4- als auch nach Furamid-Gabe nur Ethan und Pentan in erhöhten Mengen (Abb. 22 und 35).

Aus dem Muster der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe läßt sich nicht ohne weiteres auf den Schädigungsmechanismus schließen. Selektive Erhöhung von Ethan und Pentan, wie sie vor allem bei Ratten, aber auch nach Paracetamol

bei Mäusen gefunden wurde, spricht für die Bedeutung eines radikalischen Angriffs auf ungesättigte Fettsäuren. Nach in-vitro-Untersuchungen von Kessler (1987) können Ethan und Ethylen auch aus Aminosäuren und Peptiden entstehen, wenn sie mit Eisen und Sauerstoff inkubiert werden.

Wie schon erwähnt, kann das vermehrte Auftreten von Kohlenwasserstoffen im Gasraum auch die Folge einer Hemmung ihres oxidativen Metabolismus sein. Dies ist vor allem für solche leberschädigenden Substanzen anzunehmen, die Cytochrom P-450 zerstören wie CCl_4. Beim Vergleich mit Paracetamol fällt auf, daß dieses die Ethan- und Pentanabatmung in etwa gleichem Ausmaß vermehrt, CCl_4 dagegen hauptsächlich die von Pentan, das ein besseres Substrat der Monooxygenase ist als Ethan. Im Gegensatz zu CCl_4 zerstört Paracetamol die Monooxygenase nicht (Thorgeirsson 1976, Reiner et al. 1974).

Die mäßigen Anstiege von Pentan, Butan und Propan unter akuter Ethanoleinwirkung (Tab. 13 und 14) könnten auf die reversible Blockierung von Cytochrom P-450 durch Ethanol zurückgehen (Schüppel 1969). Wenn nach kombinierter Gabe von Ethanol und Eisensulfat die gemessenen Kohlenwasserstoffkonzentrationen noch wesentlich höher lagen (Abb. 25 a,b,c), so könnte es sich dabei um die Verstärkung radikalischer Prozesse handeln.

Eine besonders interessante Anwendung der Kohlenwasserstoff-Messungen ist die Verfolgung ihrer Elimination aus dem Gasraum durch Metabolismus (Abb. 18 Tab. 6). Sie bietet die Möglichkeit, Veränderungen der Aktivität der Monooxygenase nicht-invasiv und eventuell wiederholt bei Labortieren zu messen. Ein ähnlicher Zugang wurde schon auf dem Wege der Atemtests mit $^{14}CH_3$-substituierten Verbindungen gesucht, bei denen das im Metabolismus entstehende $^{14}CO_2$ abgeatmet und quantitativ verfolgt wird (Lauterburg und Bircher 1976). Die Applikation der Testsubstanz erfolgt dabei jedoch in der Regel invasiv, und man muß mit radioaktiven Isotopen arbeiten, was der Anwendung beim Menschen Grenzen setzt. Insofern bietet das hier benutzte Verfahren deutliche Vorteile.

Daß die Gasexhalation tatsächlich ein Zeichen der Schädigung von Geweben ist, ergibt sich aus ihrer weitgehenden Parallelität mit der Mortalität der Mäuse. Es starben - meist innerhalb von 10 Stunden - Tiere als Folge der Behandlung

- mit Paracetamol im Hungerzustand
- mit Paracetamol nach Methylcholanthren- (aber nicht Phenobarbital-)

Behandlung

- mit Thiophen nach Phenobarbital- (aber nicht Methylcholanthren-) Behandlung
- mit Furamid nach Phenobarbital- und Methylcholanthren-Behandlung.

Aus Tab. 4, 11 und 12 geht hervor, daß in allen diesen Fällen die Mäuse massiv erhöhte Kohlenwasserstoffmengen abgeatmet hatten.

Die Vorbehandlung mit Substanzen, die Cytochrom P-450 induzieren, bewirkte offenbar eine vermehrte Giftung der aromatischen und pseudo-aromatischen Toxine. Dabei zeigte sich eine gewisse Selektivität, die darauf schließen läßt, daß die Giftungsreaktion meist nur durch bestimmte Isoenzyme der Monooxygenase katalysiert wird.

- Die toxischen Metaboliten von Paracetamol entstehen durch die Metabolisierung von Paracetamol durch Cytochrom P-448 (3-Methylcholanthren-induzierbares Cytochrom).
- Die toxischen Metaboliten von 2-Furamid entstehen durch die Cytochrome P-450 (Phenobarbital-induzierbares Cytochrom) und P-448.
- Die toxischen Metaboliten von Thiophen entstehen durch Cytochrom P-450.

Eine Übersicht über diese Befunde, dargestellt als prozentuale Erhöhung der Kohlenwasserstoff-Konzentrationen nach 1 und 3 Stunden, geben die Tabellen 15 und 16 (im Tabellenanhang).

Die Unterscheidung in Cytochrom P-450 und P-448 ist eine sehr grobe und berücksichtigt nicht die Vielzahl der jetzt durch biochemische Techniken differenzierbaren Isoenzyme von Cytochrom P-450 (Aström und DePierre 1986). Bei Untersuchungen in vivo läßt sich aber bisher nur mit groben Unterteilungen arbeiten.

Die Natur der reaktiven Metaboliten ist noch immer umstritten. Für CCl_4 wird diskutiert, daß ein Radikal durch Reaktion mit einem Flavoprotein und nicht mit Cytochrom P-450 entsteht (Jose und Slater 1973). Durch besonders intensive Untersuchungen mit Paracetamol (Mitchell et al. 1973, Potter et al. 1973, Jollow et al. 1973) in vivo und in vitro ließen sich die kovalenten Bindungen markierten Paracetamols durch Vorbehandlung der Mäuse mit Phenobarbital verdoppeln. Auch die Lebernekrose, die durch Paracetamol verursacht wird, ließ sich steigern durch die Vorbehandlung der Mäuse mit Phenobarbital. Bei Ratten verstärkte sich die Lebernekrose (durch Paracetamol) durch Vorbehandlung mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren gleichermaßen, aber die Mortalität blieb bei allen Gruppen

(einschließlich der Kontroll-Gruppe) konstant. Auch bei der Inkubation (in vitro) von Paracetamol mit Mäuselebermikrosomen wurde Paracetamol an die Proteine gebunden.

Aus Tab. 5 wird jedoch ersichtlich, daß Paracetamol in vitro eine andere Wirkung zeigt als in vivo: es hemmt in vitro die Entwicklung von Kohlenwasserstoffen. Paracetamol wirkt hier als scavenger. Daraus könnte man ableiten, daß es zwei verschiedene Mechanismen gibt, wie Paracetamol abgebaut wird:

- ein schnellwirksamer und intensiv leberschädigender Prozeß durch die Bildung von Radikalen.
- ein langsamwirkender Prozeß der Bindung von Aromaten (bzw. ihren Metaboliten) an Proteine.

Versucht man die dargestellten Ergebnisse zu bewerten, so erscheint die Messung der Kohlenwasserstoffexhalation als Zeichen toxischer Einwirkungen verschiedener Substanzen auf die Leber (und andere Organe) gut geeignet; ebenso läßt sich die Verzögerung ihrer Elimination als Indikator einer Leberschädigung verwenden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern bei Labortieren Hepatotoxine unter verschiedenen experimentellen Bedingungen die Menge und Zusammensetzung der exhalierten Kohlenwasserstoffe verändern und ob daraus, bei Kenntnis ihrer Herkunft und des Mechanismus ihrer Bildung, Hinweise auf unterschiedliche Mechanismen der Leberzellschädigung erhalten werden können. Ferner wurde die Wirkung von Hepatotoxinen auf den Abbau der Kohlenwasserstoffe 1-Buten und Pentan geprüft.

Mäuse und Ratten, die zum Teil über längere Zeit Ethanol erhalten hatten oder mit Induktoren von Cytochrom P-450 vorbehandelt worden waren oder sich im Hungerzustand befanden, bekamen akut eine Dosis eines Hepatotoxins. Eine Stunde später wurden sie in ein gasdichtes Gefäß (Exsikkator) gesetzt, in dessen Gasphase über einen Zeitraum von bis zu 7 Stunden die Kohlenwasserstoffe Ethan, Ethylen, Propan, Butan, 1-Buten und Pentan gaschromatographisch gemessen wurden. Bei einigen Versuchen wurden die Tiere anschließend zur Bestimmung von leberspezifischen Enzymen im Serum (und/oder Malondialdehyd in der Leber) getötet. Die metabolische Elimination von 1-Buten und Pentan ergab sich aus der Messung ihres Verschwindens aus dem Exsikkator nach Injektion einer definierten Menge.

Als wesentliche Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind zu benennen:

1. Diethylmaleat, 2.5 Stunden vor CCl_4 an Ratten appliziert, verstärkte die CCl_4-Wirkung auf die Abatmung von Ethan und Pentan. Wurde Diethylmaleat 5 Stunden vor CCl_4-Gabe verabreicht, war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

2. Futterentzug hatte bei Mäusen keinen Einfluß auf die Toxizität von CCl_4; dagegen wurde die toxische Wirkung von Paracetamol bei Mäusen und von 2-Furamid bei Ratten verstärkt.

3. Die Gabe einer kleinen Dosis CCl_4 an Mäuse 4 Stunden vor der Intoxikation mit Paracetamol verringerte die Abatmung von Kohlenwasserstoffen. Wurde Paracetamol vor CCl_4 verabreicht, konnte eine verstärkte Kohlenwasserstoffexhalation beobachtet werden.

4. Bei Mäusen, die eine Stunde vor der Paracetamol-Gabe Methionin, Cystein oder Acetylsalicylsaure erhalten hatten, wurde signifikant weniger Ethan und Pentan in der Atemluft gemessen als bei nicht vorbehandelten Tieren.

5. Die Metabolisierung von Pentan und i-Buten durch Mäuse wurde durch CCl_4 und Paracetamol dosisabhängig gehemmt, wobei CCl_4 die stärkere Wirkung entfaltete. Sie war jedoch reversibel: Nach 96 Stunden wurde i-Buten mit normaler Geschwindigkeit abgebaut.

6. Die durch CCl_4 oder Eisen induzierte Abatmung von Kohlenwasserstoffen konnte durch eine vorausgegangene Ethanolgabe verstärkt werden. Bei Paracetamol dagegen ließ sich der umgekehrte Effekt von Ethanol nachweisen. Auch die Abatmung von Methan aus Dimethylsulfoxid wurde durch vorherige Ethanolgabe vermindert.

7. Ratten erhielten über mehrere Wochen Futter, das als Fett entweder Fischöl (mit vorwiegend ω-3-ungesättigten Fettsäuren) oder Maisöl (mit ω-6-ungesättigten Fettsäuren) enthielt. Nach Gabe von CCl_4 lag das Pentan/Ethan-Verhältnis bei mit Maisöl ernährten Tieren etwa 2-3mal so hoch wie bei denen, die Fischöl erhalten hatten. Dies bestätigt die Vermutung, daß diese Alkane vorwiegend durch Peroxidation ungesättigter Fettsäuren gebildet werden.

8. Weitere Kohlenwasserstoffe, die in der Atemluft auftreten, stammen offenbar aus anderen Quellen. So konnte gezeigt werden, daß i-Buten, das nach Gabe einer hohen Dosis Ethanol an Mäuse vermehrt exhaliert wurde, noch erheblich stärker anstieg, wenn die Tiere außerdem Leucin erhielten. Ferner konnte die Bildung von i-Buten aus Leucin in vitro bestätigt werden.

9. Ethylen war selektiv vermehrt nach Behandlung von Mäusen mit Ethionin;

offenbar bildet sich daraus auf einem noch unbekannten Weg Ethylen.

10. Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren verstärkte die durch Paracetamol verursachte Lipidperoxidation bei Mäusen, eine Vorbehandlung mit Phenobarbital hatte dagegen keinen Einfluß.

11. Die durch Thiophen bei Mäusen ausgelöste Kohlenwasserstoffexhalation konnte durch Vorbehandlung mit Phenobarbital, aber nicht mit 3-Methylcholanthren verstärkt werden.

12. Vorbehandlung von Ratten und Mäusen mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren verstärkte die 2-Furamid-induzierte Abatmung von Ethan und Pentan.

Soweit die exhalierten Kohlenwasserstoffe aus endogenen Substraten stammen, bildet ihr Auftreten einen leicht und eventuell sogar wiederholt meßbaren Parameter zur Beurteilung toxischer Wirkungen. Das ließ sich hier erhärten durch weitgehende Parallelität von massivem Anstieg der Abatmung von Kohlenwasserstoffen und Mortalität der Tiere nach verschiedenen Behandlungen.

Tabelle 13: Prozentuale Änderung gegenüber Kontrollen in der Kohlenwasserstoff-Konzentration im Exsikkator 1 Stunde nach Einsetzen von gefutterten NMRI-Mäusen, die mit Hepatotoxinen behandelt waren.

Behandlung	Dosis kg^{-1} ip	Ethan	Pentan	Ethylen	Propan	n-Butan	i-Buten
Ethanol	2 g	+20	+300	+60	±0	+50	+1200
CCl_4	0.4 ml	+60	+900	-15	±0	±0	±0
Paracetamol (gefüttert)	500 mg	±0	+300	+60	±0	±0	±0
Paracetamol (gehungert)	500 mg	+680	+900	+15	±0	±0	±0
Thiophen	300 mg	-20	+1900	+60	+30	+200	±0
2-Furamid	250 mg	+100	±0	+140	+170	+100	±0
Brombenzol	1 ml	±0	+1400	+60	+30	+100	±0

Tabelle 14: Prozentuale Änderung gegenüber Kontrollen in der Kohlenwasserstoff-Konzentration im Exsikkator 3 Stunden nach Einsetzen von gefütterten NMRI-Mäusen, die mit Hepatotoxinen behandelt waren.

Behandlung	Dosis kg^{-1} ip	Ethan	Pentan	Ethylen	Propan	n-Butan	i-Buten
Ethanol	2 g	+40	+40	+90	+250	+250	+3600
CCl_4	0.4 ml	+140	+2100	±0	+200	+200	+800
Paracetamol (gefüttert)	500 mg	+60	+300	+40	+50	+50	+300
Paracetamol (gehungert)	500 mg	+3300	+6200	+110	+250	+300	±0
Thiophen	300 mg	+50	+2900	+130	+350	+500	±0
2-Furamid	250 mg	+180	±0	+230	+600	+250	±0
Brombenzol	1 ml	+25	+2100	+140	+200	+250	+1200

Tabelle 15: Der Einfluß der Induktion auf die Kohlenwasserstoffabatmung (in Prozent über die Kontrolle) nach 1 Stunde bei gefütterten weiblichen Mäusen nach der Intoxikation mit verschiedenen Hepatotoxinen.

Behandlung	Dosis kg^{-1} ip	Ethan	Pentan	Ethylen	Propan	n-Butan
Paracetamol	400 mg	±0	+200	±0	-70	-50
Pb Paracetamol	400 mg	+40	+100	+15	-70	-50
MC Paracetamol	400 mg	+500	+700	+100	±0	±0
Thiophen	300 mg	-20	+1900	+60	+30	+200
Pb Thiophen	300 mg	+140	+1900	+90	+130	+200
MC Thiophen	300 mg	-20	+1100	+110	+30	+150
2-Furamid	250 mg	+100	-	+140	+170	+100
Pb 2-Furamid	250 mg	+100	+200	+90	+70	+100
MC 2-Furamid	250 mg	-30	±0	+30	+30	±0

Tabelle 16: Der Einfluß der Induktion auf die Kohlenwasserstoffabatmung (in Prozent über die Kontrolle) nach 3 Stunden bei gefütterten weiblichen Mäusen nach der Intoxikation mit verschiedenen Hepatotoxinen.

Behandlung	Dosis kg^{-1} ip	Ethan	Pentan	Ethylen	Propan	n-Butan
Paracetamol	400 mg	+40	±0	-25	+50	±0
Pb Paracetamol	400 mg	+25	±0	+140	±0	±0
MC Paracetamol	400 mg	+2100	+3000	+100	+150	+150
Thiophen	300 mg	+50	+2900	+130	+350	+500
Pb Thiophen	300 mg	+980	+9200	+150	+800	+500
MC Thiophen	300 mg	+100	+2900	+200	+400	+550
2-Furamid	250 mg	+180	±0	+130	+600	+250
Pb 2-Furamid	250 mg	+710	+3900	+160	+400	+350
MC 2-Furamid	250 mg	+580	+6000	+100	+350	+300

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Albano, E.; Poli, G.; Chiarpotto, E.; Biasi, F. und Dianzani, M.; Chem.-Biol. Interactions. 47, 249-263 (1983)

Allemand, H.; Pessayre, D.; Descaroire, V.; Degott, D.; Feldman, G. und Benhamu, J.-P.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 204, 714-723 (1978)

Ammon, R.; Beringer, H.; Haas, H.J. und Landesberg; Arzneim.-Forsch. 17, 521-524 (1967)

Anders, M.W.; Biochem. Pharmacol. 27, 1098-1101 (1978)

Aström, A. und DePierre, J.W.; Biochim. Biophys. Acta 853, 1-28 (1986)

Beales, D.; Hue, D.P. und McLean, A.E.M.; Biochem. Pharmacol. 34, 19-23 (1985)

Bechtold, M.M.; Gee, D.L.; Brunner, U. und Tappel, A.L.; Toxicol. Letters 11, 165-171 (1982)

Boyd, E.M. und Bereczky, G.M.; Brit. J. Pharmacol. 26, 606-614 (1966)

Breen, K.; Wandscheer, J.-C.; Peignoux, M.; Pessayre, D.; Biochem. Pharmacol. 31, 115-116 (1982)

Brodie, B.B.; Reid, W.D.; Cho, A.K.; Sipes, G.; Krishna, G. und Gillette, J.R.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 160-164 (1971)

Burk, F.R.; Ludden, T.M. und Lane, J.M.; Gasteroenterology 84, 138-142 (1983)

Casini, A.F.; Ferrali, M.; Pompella, A.; Maellaro, E. und Comporti, M.; Am. J. Pathol. 123, 520-531 (1986)

Casini, A.F.; Pompella, A. und Comporti, M.; Am. J. Pathol. 118, 225-237 (1985)

Castro, J.A. und Diaz Gómez, M.I.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 541-552 (1972)

Cederbaum, A.I.; Dicker, E. und Cohen, G.; Biochemistry 17, 3058-3064 (1978)

Cederbaum, A.K.; Dicker, E.; Rubin, E. und Cohen, G.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1258-1261 (1977)

Cederbaum, A.I.; Miwa, G.; Cohen, G. und Lu, A.Y.H.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 747-754 (1979)

Cederbaum, A.I.; Dicker, E. und Cohen, G.; Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems - IV; Advances in Experimental Medicine and Biology, vol.132 (1980)

Cherrick, G.R. und Leevy, C.M.; Biochim. Biophys. Acta 107, 29-37 (1965)

Comporti, M.; Landucci, G. und Raja, F.; Experientia, 27, 1155-1156 (1971)

Comporti, M.; Benedetti, A. und Chieli, E.; Lipids 8, 498-502 (1973)

Corcoran, G.B.; Todd, E.L.; Racz, W.J.; Huges, H.; Smith, C.V. und Mitchell, J.R.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 857-863 (1985)

Corcoran, G.B.; Racz, W.J.; Smith, C.V. und Mitchell, J.R.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 864-872 (1985)

Cornish, H. und Adefuin, J.; Amer. Industr. Hyg. Assoc. J. 27, 57-61 (1966)

Cornish, H. und Adefuin, H.; Arch. Environ. Health 14, 447-449 (1967)

De Groot, H. und Haas, W.; FEBS Letters. 115, 253-256 (1980)

De Vries, J.; TIPS. 393-394. (September 1983)

Díaz Gómez, M.I.; Castro, J.A.; De Ferreyra, E.C.; D'Acosta, N. und DeCastro, C.R.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 534-541 (1973)
Dillard, C.J.; Dumelin, E.E. und Tappel, Al.; Lipids 12, 109-114 (1977)
Dillard, C.J.; Litov, R.E. und Tappel, Al.; Lipids 13, 396-402 (1978)
DiLuzio, N.R. und Hartman, A.D.; Fed. Proc. 26, 1436-1442 (1967)
Donovan, D.H. und Menzel, D.B.; Experientia 34, 775-776 (1978)
Dumelin, E.E. und Tappel, A.; Lipids 12, 894-900 (1977)
Fairhurst, S.; Barber, D.J.; Clark, B. und Horton, A.A.; Toxicology 23, 249-259 (1982)
Filser, J.G. und Bolt, H.M.; Arch. Toxicol. 42, 123-136 (1979)
Frank, H.; Hintze, T.; Bimboes, D. und Remmer, H.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 337-344 (1980a)
Frank, H.; Hintze, T.; Remmer, H.; in: Kolb, B. (ed.); Applied headspace gas chromatography; Heyden and Son Ltd., London; S. 155-164 (1980b)
Frank, H. und Dürk; Arch. Toxicol. 53, 213-223 (1983)
Frank, H. und Link, B.; Biochem. Pharmacol. 33, 1127-1130 (1984)
Frank, H. (1987): persönliche Mitteilung
Frommer, U.; Ullrich, V. und Staudinger, H.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 903-912 (1970)
Gadeholt, G.; Acta Pharmacol. et Toxicol. 55, 216-223 (1984)
Garner, R.C. und McLean, A.E.M.; Biochem. Pharmacol. 18, 645-650 (1969)
Gee, D.L. und Tappel, Al.L.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 60, 112-120 (1981)
Ghoshal, A. und Recknagel, R.O.; Life Sciences 4, 2195-2209 (1965)
Gillette, J.R.; Menard, R.H. und Stripp, B.; Clin. Pharmacol. Ther. 14, 680-692 (1973)
Glende, E.A.; Biochem. Pharmacol. 21, 1697-1702 (1972)
Glende, E.A.; Hruszkewycz, A.M. und Recknagel, R.O.; Biochem. Pharmacol. 25, 2163-2170 (1976)
Glinsukon, T.; Tycharpipranai, S. und Toskulkao, C.; Experientia 34/7, 869-870 (1978)
Goheen, S.C.; Pearson, E.E.; Larkin, E.C. und Rao, G.A.; Lipids 16, 43-51 (1981)
Goulding, R.; The Lancet 2, 829-830 (1976)
Green, M.D. und Fischer, L.J.; Life Sciences 29, 2421-2428 (1981)
Hafeman, D.G. und Hoekstra, W.G.; J. Nutr. 107, 656-665 (1977)
Hafeman, D.G. und Hoekstra, W.G.; J. Nutr. 107, 666-672 (1977)
Hammer, C.T. und Wills, E.D.; Biochem. J. 174, 585-593 (1978)
Harris, R.N. und Anders, M.A.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 26, 191-198 (1980)
Harvy, M.J. und Klaassen, C.D.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 71, 316-322 (1983)
Hasumura, Y.; Teschke, R. und Lieber, C.S.; Gastroenterology 66, 415-422 (1974)
Heni, N. und Remmer, H.; Arch. Toxikol. 28, 1-11 (1971)
Hewitt, W.R.; Miyajima, H.; Côte, M.G. und Plaa, G.L.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 53, 230-248 (1980)
Hinson, J.A.; Mays, J.B. und Cameron, A.M.; Biochem. Pharmacol. 32, 1979-1988 (1983)

Hintze, T.; Dissertation, Tübingen (1981)
Horvat, R.J.; Lane, W.G.; Ng, H. und Shepherd, A.D.; Nature 203, 523-524 (1964)
Hoffmann, K.J.; Streeter, A.J.; Axworthy, D.B. und Baillie, T.A.; Molecular Pharmacol. 27, 566-573
Högberg, J.; Orrenius, S. und O'Brien, P.J.; Eur. J. Biochem. 59, 449-455 (1975)
Ilyas, M.S.; De La Iglesia, F.A. und Feuer, G.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 69-77 (1978)
Ioannides, C.; Steele, C.M. und Park, D.V.; Toxicol. Lett. 16, 55-61 (1983)
Ioannides, C.; Lum, P.Y. und Park, D.V.; Xenobiotica 14, 119-137 (1984)
Isselbacher, J.K. und Greenberger, N.J.; New Eng. J. Med. 270, 351-356 (1964)
Isselbacher, J.K. und Greenberger, N.J.; New Eng. J. Med. 270, 402-410 (1964)
Jollow, D.J.; Mitchell, J.R.; Potter, W.Z.; Davis, D.C.; Gillette, J.R. und Brodie, B.B.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 195-202 (1973a)
Jollow, D.J.; Thorgeirsson, S.S.; Potter, W.Z.; Mitchell, J.R.; Gillette, J.R. und Brodie, B.B.; Fed. Proc. 32, 305 Abs (1973b)
Jollow, D.J.; Thorgeirsson, S.S.; Potter, W.Z.; Hashimoto, M. und Mitchell, J.R.; Pharmacology 12, 251-271 (1974)
Joly, J.G.; Ishii, H.; Teschke, R.; Hasumura, Y. und Lieber, C.S.; Biochem. Pharmacol. 22, 1532-1535 (1973)
Jose, P.J. und Slater, T.F.; Xenobiotica 3, 357-366 (1973)
Kalish, G.H. und DiLuzio, N.R.; Science. 152, 1390-1392 (1966)
Kappus, H.; Ottenwälder, H. und Stacey, N.H.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 62, 421-427 (1982)
Kappus, H. und Stacey, N.H.; J. Toxicol. Environ. Health 9, 277-285 (1982)
Kato, R. und Gillette, J.R.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 279-284 (1965)
Kato, R.; Biochem. Pharmacol. 16, 871-887 (1967)
Kessler, W.; Dissertation (1987), in Vorbereitung
Khanna, J.M.; Kalant, H.; Lin, G. und Bustos, G.O.; Biochem. Pharmacol. 20, 3269-3279 (1971)
Khanna, J.M.; Kalant, H. und Lin, G.; Biochem Pharmacol. 21, 2215-2226 (1972)
Khanna, J.M.; Kalant, H.; Yee, Y.; Chung, S. und Siemens, A.J.; Biochem. Pharmacol. 25, 329-335 (1976)
Kleczka, H. und Kappus, H.; Toxicol. Letters 5, 191-196 (1980)
Kivits, G.A.A.; Ganguli-Swarttouw, M.A.C.R. und Christ, E.J.; Biochim. Biophys. Acta 665, 559-570 (1981)
Klaassen, C.D. und Plaa, G.L.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 9, 139-151 (1966)
Klaassen, C.D. und Plaa, G.L.; Biochem. Pharmacol. 18, 2019-2027 (1979)
Koch, R.R.; Glende, E.A. und Recknagel, R.O.; Biochem. Pharmacol. 23, 2907-2915 (1974)
Kutob, S.D. und Plaa, G.L.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 135, 245-251 (1962)
Lai, E.K.; McCay, P.B.; Noguchi, T. und Fong, K.-L.; Biochem. Pharmacol. 28, 2231-2235 (1979)
Lauterburg, B.H. und Bircher, J.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 501-509

(1976)
Lawry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. und Randall, R.J.; J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
Lieber, C.S. und DeCarli, L.M.; Science 162, 917-918 (1968)
Lieber, C.S. und DeCarli, L.M.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 181, 274-287 (1972)
Lindstrom, T.D.; Anders, M.W. und Remmer, H.; Exp. Mol. Pathol. 28, 48-57 (1978)
Lindstrom, T.D. und Anders, M.W.; Biochem. Pharmacol. 27, 563-567 (1978)
Link, B.; Dürk, H.; Thiel, D. und Frank, H.; Biochem. J. 223, 577-586 (1984)
Lokesh, B.R.; Mathur, S.N. und Spector, A.A.; J. Lipid Res. 22, 905-915 (1981)
Luoma, P. und Vorne, M.; Acta Pharmacol. et Toxicol. 38, 260-266 (1976)
Maling, H.M.; Stripp, B.; Sipes, I.G.; Highman, B.; Saul, W. und Williams, M.A.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 33, 291-308 (1975)
Malov, S. und Baesl, T.J.; Biochem. Pharmacol. 21, 1667-1678 (1972)
Masuda, Y. und Murano, T.; Biochem. Pharmacol. 27, 1983-1985 (1978)
McLean, A.E.M. und McLean, E.K.; Biochem. J. 100, 564-571 (1966)
McLean, A.E.M. und Day, P.A.; Biochem. Pharmacol. 24, 37-42 (1975)
McMurtry, R.J. und Mitchell, J.R.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 42, 285-300 (1977)
Miranda, C.L.; Henderson, M.C.; Schmitz, J.A. und Buhler, D.R.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 69, 73-80 (1983)
Mitchell, J.R.; Reid, W.D.; Christie, B.; Moskowitz, J.; Krishna, G. und Brodie, B.B.; Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 2, 877-888 (1971)
Mitchell, J.R.; Jollow, D.J.; Potter, W.Z.; Gillette, J.R. und Brodie, B.B.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 211-217 (1973)
Mitchell, J.R.; Jollow, D.J.; Potter, W.Z.; Davis, D.C.; Gillette, J.R. und Brodie, B.B.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 185-194 (1973)
Mitchell, M.C.; Hoyumpa, A.; Schenker, S. und Patwardhan, R.V.; Biochem. Pharmacol. 31, 695-699 (1982)
Montgomery, M.R. und Rubin, R.J.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 179, 465-473 (1971)
Müller, A. und Sies, H.; Biochem. J. 206, 153-156 (1982)
Nakata, R.; Tsukamoto, I.; Miyoshi, M. und Kojo, S.; Biochem. Pharmacol. 34, 586-588 (1985)
Nelson, S.D.; Snodgrass, W.R. und Mitchell, J.R.; Fed. Proc. 34, 784 (1975)
Oesch, F.; Xenobiotica 3, 305-340 (1973)
Ohmiya, Y.; J. Toxicol. Sci. 2, 25-33 (1977)
Orrenius, S.; Thor, H.; Eklöw, L.; Moldéns, P. und Jones, D.P.; Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 136A (1982)
Pennington, S.N.; Smith, C.P. und Tapscott, E.B.; Alcoholism. 2, 311-316 (1978)
Pessayre, D; Wandscheer, J.C.; Cobert, B.; Leuel, R.; Degott, C.; Batt, A.M.; Martin, N. und Benhamu, J.-P.; Biochem.Pharmacol. 29, 2219-2223 (1980)
Pessayre, D.; Peignoux, M.; Wandscheer, J.-C.; Breen, K.; Biochem. Pharmacol. 31, 115-116 (1982)
Plaa, G.L.; Evans, E.A. und Hine, C.H.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 123, 224-522

(1958)
Plaa, G.L. und Hewitt, W.R.; in: Toxicology of the liver; Ed. by Gabriel Plaa and William R. Hewitt; Raven Press, New York (1982)
Potter, W.Z.; Davis, D.C.; Mitchell, J.R.; Jollow, D.J.; Gillette, J.R. und Brodie, B.B.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 203-210 (1973)
Powis, G.; Biochem. J. 148, 269-277 (1975)
Prescott, L.F.; Wright, N.; Roscoe, P.; Brown, S.S.; The Lancet 13, 519-522 (1971)
Prescott, L.F.; Drugs 25, 290-314 (1983) Review Articles
Remmer, H.; Albrecht, D. und Kappus, H.; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 107-113 (1977)
Remmer, H. und Gharaibeh, A.-M.; Biochem. soc. Transa. 12, 28-30 (1984)
Remmer, H.; Hintze, T.; Frank, H. und Müh-Zange, M.; Xenobiotica 14, 207-219 (1984)
Remmer, H.; Hintze, T.; de Toranzo, E.G.D. und Frank, H.; Oxygen Radicals in Chemistry and Biology, 335-339 (1984), Walter de Gruyter & Co., Berlin/New York
Recknagel, R.O.; Glende, E.A.; Hruszkewycz, A.M.; in: Free Radicals in Biology; Ed by W.A. Pryor; Vol.111, S.97; Academic Press, New York (1977)
Recknagel, R.O. und Ghoshal, A.K.; Lab. Investigation 15, 132-146 (1966)
Recknagel, R.O.; Glende, E.A.; Ugazio, G.; Koch, R.R. und Srinivasan, S.; Israel. J. Med. Sci. 10, 301-334 (1974)
Recknagel, R.O.; Glende, E.A.; Waller, R.L. und Lowry, K.; in: 'Toxicology of the Liver' ed. by Plaa, G. und Hewitt, W.R.; New York, Raven Press (1982)
Reiner, O.; Athanassopoulos, A.; Hellmer, K.H.; Murray, R.E. und Uehleke, H.; Arch. Toxikol. 29, 219-233 (1972)
Reiter, R. und Wendel, A.; Chem.-Biol. Interactions 40, 365-374 (1982)
Reitman, S. und Frankel, S.; Amer. J. Clin. Path. 28, 56-64 (1957)
Reynolds, E.S.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 155, 117-126 (1967)
Reynolds, E.S. und Moslen; Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, 377-388 (1974)
Riely, C.A.; Cohen, G.; Lieberman, M.; Science 183, 208-210 (1974)
Rosen, G.M.; Singletary, W.V.; Rauckman, E.J.; Killenberg, P.G.; Biochem. Pharmacol. 32, 2053-2059 (1983)
Rush, G.F.; Adler, V.L. und Hook, J.B.; Toxicol. Letters 12, 265-271 (1982)
Sato, C. und Lieber, C.S.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 218, 811-815 (1981)
Sato, C.; Nakano, M. und Lieber, C.S.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 218, 805-810 (1981)
Sato, A.; Nakajima und Koyama, Y.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 60, 8-15 (1981)
Schiff, L.; Diseases of the Liver, 4th ed.; J.B. Lippincott Company, Philadelphia/Toronto (1975)
Schmidt, E. und Schmidt, F.W.; Kleine Enzym-Fibel; Schriftenreihe Diagnostica Boehringer, Mannheim (1973)
Scholler, K.L.; Müller, E. und Plehwe, U.; Anaesthesist 17, 87-90 (1968)
Schüppel, ; Naunyn-Schmidebergs Arch. Pharmak. 265, 156-169 (1969)
Shen, E.S.; Garry, V.F. und Anders, M.W.; Biochem. Pharmacol. 31, 3787-3793 (1982)

Siegers, C.-P.; Filser, J.G. und Bolt, H.M.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 46, 709-716 (1978)
Siegers, C.-P.; J. Pharmac. Pharmac. 30, 375-377 (1978)
Siegers, C.-P.; Strubelt, O. und Völpel, M.; Arch. Toxicol. 41, 79-88 (1978)
Sipes, G.; Stripp, B.; Krishna, G.; Maling, H.M. und Gillette, J.R.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 237-240 (1973)
Sherlock, S.; The Lancet 436-438 (1984)
Shaw, S.; Leber Magen Darm 8, 265-270 (1978)
Shaw, S. und Lieber, C.S.; Gastroenterology 74, 677-682 (1978)
Shank, R.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 31, 361-368 (1975)
Smuckler, E.A.; Arrhenius, E. und Hultin, T.; Biochem. J. 103, 55-64 (1967)
Slater, T.F.; Nature 209, 36-40 (1966)
Slater, T.F. und Sawyer, B.C.; Biochem. J. 123, 823-828 (1971)
Slater, T.F.; in: Free Radical Mechanisms in Tissue Injury; S. 91-170; Pion Publ., London (1972)
Smith, M.R.; Thor, H.; Hartzell, P. und Orrenius, S.; Biochem. Pharmacol. 31, 19-26 (1982)
Stacey, N. und Priestly, B.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 41-48 (1978)
Steven, J.L. und Anders, M.W.; Chem.-Biol. Interactions, 37, 207-217 (1981)
Strubelt, O.; Siegers, C.-P. und Breining, H.; Arch. Toxicol. 29, 129-141 (1972)
Strubelt, O.; Siegers, C.-P. und Breining, H.; Arch. Toxicol. 32, 83-95 (1974)
Strubelt, O.; Obermeier, F. und Siegers, C.-P.; Acta Pharmacol. et toxicol. 43, 211-218 (1978)
Strubelt, O.; Obermeier, F.; Siegers, C.-P. und Völpel, M.; Toxicology 10, 216-270 (1978)
Strubelt, O.; Biochem. Pharmacol. 29, 1445-1449 (1980)
Strubelt, O.; Dost-Kempf, E.; Siegers, C.-P.; Younes, M ; Völpel, M.; Preuss, U. und Dreckmann, J.G.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 60, 66-77 (1981)
Strubelt, O. und Breining, H.; Toxicol. Lett. 6, 109-113 (1980)
Suarez, K.A.; Carlson, G.P.; Fuller, G.C. und Fausto, N.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 171-177 (1972)
Suarez, K.A.; Carlson, G.P.; Fuller, G.C.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 789-791 (1972)
Suarez, K.A.; Griffin, K.; Kopplin, R.P. und Bhonsle, P.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 57, 318-324 (1981)
Teschke, R.; Hauptmeier, K.H. und Frenzel, H.; Liver 3, 100-109 (1983)
Teschke, R.; Vierke, W. und Gellert, J.; Arch. Toxicol. 56, 78-82 (1984)
Teschke, R.; Neuefeind, M.; Altrogge, G.; Borchard, F.; Frenzel, H.; Fritsch, W.-P.; Miller, B.; Wienbeck, M.; Grabensee, B. und Strohmeyer, G.; Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 84, 1084-1087 (1978)
Thor, H.; Svensson, S.-A.; Hartzell, P. und Orrenius, S.; Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 136A (1982)
Thorgeirsson, S.S.; Sasme, H.A.; Mitchell, J.R.; Jollow, D.J. und Potter, W.Z.; Pharmacology, 14, 205-217 (1976)
Timbril, J.A.; Principles of biochemical toxicology; Taylor & Francis Ltd.,

London (1982)
Toranzo, E.G.D. de; Díaz Gómez, M.I. und Castro, J.A.; Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 19, 347-352 (1978)
Traiger, G.J. und Plaa, G.L.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 481-488 (1972)
Traiger, G.J. und Bruckner, J.V.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 493-500 (1976)
Traiger, G.J. und Plaa, G.L.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 20, 105-112 (1971)
Tredger, J.M.; Smith, H.M.; Davis, M. und Williams, R.; Toxicol. Lett. 5, 339-344 (1980)
Tsukamoto, S.; Chiba, S.; Muto, T.; Ishikawa, T. und Shimamura, M.; The. J. Toxicol. Scien. 10, 323-332 (1985)
Uehleke, H. und Werner, Th.; Arch. Toxicol. 34, 289-308 (1975)
Uehleke, H.; Werner, T.; Greim, H. und Krämer, M.; Xenobiotica 7, 393-400 (1977)
Valenzuela, A.; Fernandez, N.; Ugarte, G. und Videla, L.A.; FEBS letters 111, 11-13 (1980)
Videla, L.A.; Fernandez, V.; Ugarte, G. und Valenzuela, A.; FEBS letters 111, 6-10 (1980)
Wallgren, H. und Barry, H.; Actions of Alcohol, vol.1 (1970)
Ward, L.C.; Carrington, L.E. und Daly, R.; Int. J. Biochem. 17, 187-193 (1985a)
Ward, L.C.; Ramm, G.A.; Mason, S. und Daly, R.; Int. J. Biochem. 17, 195-201 (1985b)
Wendel, A.; Feuerstein, S. und Konz, K.-H.; Biochem. Pharmacol. 28, 2051-2055 (1979)
Wendel, A. und Feuerstein, S.; Biochem. Pharmacol. 30, 2513-2520 (1981)
Wendel, A.; Jaeschke, H.; Biochem. Pharmacol. 31, 3601-3605 (1982)
Wong, L.T.; Whitehouse, L.W.; Solomonray, G. und Paul, C.J.; Toxicology 17, 297-309 (1980)
Whitehouse, L.W.; Paul, C.J. und Thomas, B.H.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 38, 571-582 (1976)
Zampaglione, N.; Jollow, D.J.; Mitchell, J.R.; Stripp, B.; Hamrick, M. und Gillette, J.R.; J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 218-227 (1973)

Lebenslauf

Name:	Abd el Majid Gharaibeh
Geburtstag:	27.8.1949
Geburtsort:	Irbid/Jordanien
Eltern:	Saleh Gharaibeh, Beamter und Zainab Gharaibeh
Schulbildung:	Grundschule von 1957-1963 Mittelschule von 1963-1966 Gymnasium von 1966-1968
Reifeprüfung:	1968
Prüfung zur Feststellung der Hochschulreife ausländischer Studierender (Bewertungsgruppe II):	Oktober 1972
Studium:	Pharmazie Wintersemester 1972/73 bis August 1976 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Staatsexamen:	18. August 1978 in Stuttgart
Jordanische Approbation:	1979
Dissertation:	Seit Juli 1980 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. H. Remmer

Meine akademischen Lehrer waren:

Pharmazeutische Chemie:	H. Auterhoff, K.A. Kovar
Pharmazeutische Technologie:	E. Graf
Pharmazeutische Biologie:	E. Reinhard
Pharmakologie für Naturwissenschaftler:	H.P.T. Ammon
Organische Chemie:	E. Bayer
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie:	R.E. Bader